



AMANITIN

ELISA

EK-AM1

96 tests

Revision date: 2013-01-24

ENGLISH

INTENDED USE

The BÜHLMANN Amanitin ELISA kit is intended for the direct and quantitative *in vitro* diagnostic determination of α - and γ -Amanitin present in human urine, serum and plasma.

PRINCIPLE OF THE ASSAY

The BÜHLMANN Amanitin ELISA is a competitive immunoassay. A polyclonal antibody (Ab) specific for α - and γ -Amanitin (1,2) has been coated onto the wells of the Microtiter Plate. During the first incubation, Amanitin present in the prediluted urine samples and the calibrators, respectively, competes with biotinylated Amanitin for the binding sites of the specific rabbit anti-Amanitin antibody. After washing, streptavidin conjugated to horseradish peroxidase (HRP) is added, which binds during a second incubation step to the Biotin-Ab complexes. Unbound enzyme label is removed by a second washing step and tetramethylbenzidine (TMB) Substrate Solution is added to the wells. During the following incubation step, a colored product is formed in inverse proportion to the amount of Amanitin present in the sample. Upon addition of acidic Stop Solution the color changes from blue to yellow and can be measured at 450 nm.

REAGENTS SUPPLIED AND PREPARATION

Reagents	Quantity	Code	Reconstitution
Microtiter Plate precoated with anti- α -Amanitin polyclonal Ab.	12 x 8 wells	B-EKAM1-MP	Ready to use
Plate Sealer	3 pieces		
Wash Buffer Concentrate (10x) with preservatives	1 bottle 100 ml	B-EKAM1-WB	Dilute with 900 ml of deionized water
Incubation Buffer with preservatives	1 bottle 100 ml	B-EKAM1-IB	Ready to use
Blanking Reagent ^{*)} lyophilized amanitin in a buffer matrix with preservatives	1 vial lyophilized	B-EKAM1-BR	Add 1 ml of Incubation Buffer
Calibrators A to E ^{**)} lyophilized α -amanitin in a buffer matrix with preservatives	5 vials	B-EKAM1-CASET	Add 1 ml of Incubation Buffer
Control Low / High ^{***)} lyophilized amanitin within human urine	2 vials	B-EKAM1-CONSET	Add 1 ml of Incubation Buffer
Biotin Conjugate amanitin conjugated to biotin in a buffer matrix with preservatives	1 vial 5.5 ml	B-EKAM1-BC	Ready to use
Enzyme Label streptavidin conjugated HRP in a protein-based buffer with preservatives	1 vial 11 ml	B-EKAM1-EL	Ready to use
TMB Substrate TMB in citrate buffer with H ₂ O ₂	1 vial 11 ml	B-TMB	Ready to use
Stop Solution 0.25 M sulfuric acid	1 vial 11 ml	B-STs	Ready to use Corrosive agent

Table 1

^{*)} The Blanking Reagent contains 100 μ g/ml α -Amanitin.

^{**)} After reconstitution the Calibrators A, B, C, D and E contain 1, 3, 10, 30 and 100 ng/ml of α -Amanitin, respectively.

^{***)} The Controls contain lot-specific amounts of α -Amanitin. Refer to the additional QC Data Sheet for actual concentrations.

STORAGE AND SHELF LIFE OF REAGENTS

Unopened Reagents	
Lyophilized Calibrators, Controls and Blanking Solution must be stored at -20°C. The other unopened kit components are stable at 2-8°C. Do not use past kit expiration date.	
Opened / Reconstituted Reagents	
Microtiter Plate	Return unused strips immediately to the aluminum pouch containing the desiccant packs and reseal along the entire edge of zip-seal. Store for up to 2 months at 2-8°C.
Diluted Wash Buffer	Store for up to 4 months at 2-8°C.
Controls	Stable at -20°C for at least 3 months
Calibrators	
Blanking Solution	
Incubation Buffer	Stable at 2-8°C until expiration date marked on the vial
Biotin Conjugate	
Enzyme Label	
Substrate Solution	Store in darkness at 2-8°C until expiration date.
Stop Solution	Store at 18-28°C.

Table 2

WARNINGS AND PRECAUTIONS

- **Substrate and Stop Solution:** Substrate and Stop Solution: The Substrate TMB (B-TMB) contains Tetramethylbenzidine, hydrogen peroxide (H₂O₂) and dimethylformamide. The Stop Solution (B-STs) contains sulfuric acid (0.25 M). Each of those reagents is irritant to eyes, skin and mucous membranes. Avoid contact with Eyes, skin and cloths Wear suitable protective clothing, gloves and eye protection. After contact with eyes or skin, wash immediately with plenty of water.
- **Blanking Reagent, Calibrators, Controls, and Biotin Conjugate:** Contain α -amanitin. Avoid intake of these reagents
- Unused solution should be disposed of according to local State and Federal regulations.

TECHNICAL PRECAUTIONS

Kit components

- **Residues in the microtiter plate** wells result from the production process. They are removed in the washing step (Assay procedure step 3) and do not affect the results.
- Read carefully the instructions for use prior to carrying out the test. Test performance will be adversely affected, if reagents are incorrectly diluted, modified or stored under conditions other than those as detailed in this instruction for use.
- Components must not be used after the expiry date printed on the labels.
- Do not mix different lots of reagents.
- Every effort should be made to ensure that no cross contamination occurs between reagents, samples or between wells.
- Let the reagents adjust to reach room temperature. Mix well (vortex) the reagents before use.
- Microwells cannot be re-used.
- Repeated freezing and thawing of reagents supplied in this kit must be avoided.
- The enzyme (HRP) used as the label is inactivated by oxygen and is highly sensitive to Sodium azide, Thimerosal, Hypochlorous acid and aromatic Chlorohydrocarbons often found in laboratory water supplies. Therefore, use only deionized or distilled high quality water.
- If the initial concentration of an unknown sample reads greater than the highest calibrator (Calibrator E), the sample should be further diluted with incubation buffer and assayed again according to the assay procedure. The

resulting dilution factor must be accounted for final calculations.

MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

- Precision pipettes with disposable tips for 40 µl, 50 µl, 100 µl and 1 ml.
- Multishot pipettes with disposable tips for 50 µl and 100 µl.
- Disposable polystyrene or polypropylene tubes for the preparation of sample dilutions.
- 1000 ml cylinder for the dilution of the Wash Buffer concentrate.
- Blotting Paper
- Microtiter Plate washer or squeeze bottle for the Wash Buffer.
- Microtiter Plate rotator.
- Microtiter Plate reader for measurement of absorbance at 450 nm.

SPECIMEN COLLECTION AND STORAGE

- The assay procedure calls for less than 50 µl of urine, serum or plasma.
- Collect patient urine, serum or plasma and keep the specimen refrigerated. Aliquots may be stored for up to 7 days at 2-8°C or for at least 6 months frozen at -20 °C.
- To reach highest sensitivity, urinary sample collection must be within 36 hours after mushroom ingestion (see Chapter Normal Values and Interpretation of Results)

ASSAY PROCEDURE

1. Dilute all patient samples 1:25 with Incubation Buffer (e.g. 40 µl of urine + 960 µl of Incubation Buffer).
2. Prepare a plate with sufficient strips to test the desired number of calibrators and samples. Remove excess strips from the holder and reseal them in the foil pouch together with the desiccant packs **without delay**. Store refrigerated.
Important: Allow the reagents to come to 18-28 °C before setting up the assay.
3. Wash the coated wells twice using at least 300 µl of Wash Buffer per well. Empty the wells and tap the plate firmly onto blotting paper.
- 4a. Pipet 50 µl of Blanking Solution (Blank) in duplicate into wells A1+A2.
Pipet 50 µl of Incubation Buffer (Zero Calibrator) in duplicate into wells B1+B2.
Pipet 50 µl of Calibrator A in duplicate into wells C1+C2.
Pipet 50 µl of Calibrator B in duplicate into wells D1+D2.
Pipet 50 µl of Calibrator C in duplicate into wells E1+E2.
Pipet 50 µl of Calibrator D in duplicate into wells F1+F2.
Pipet 50 µl of Calibrator E in duplicate into wells G1+G2.
- 4b. Pipet 50 µl of the Low Control in duplicate into wells H1+H2.
Pipet 50 µl of the High Control in duplicate into wells A3+A4.
- 4c. Pipet 50 µl of each diluted sample (1:25) in duplicate into the subsequent wells.
5. Pipet 50 µl Biotin Conjugate to all wells.
6. Cover the plate with a Plate Sealer, place the plate on a plate rotator set at 400-600 rpm and incubate for 30 ± 5 minutes at 18-28 °C.
7. Remove and discard the Plate Sealer. Empty the wells and wash three times using at least 300 µl of Wash Buffer per well. Empty the wells and strike the plate firmly onto blotting paper.
8. Pipet 100 µl of Enzyme Label into all wells.

9. Cover the plate with a Plate Sealer, place the plate on a plate shaker set at 400-600 rpm and incubate for 15 ± 5 minutes at 18-28 °C.
10. Remove and discard the Plate Sealer. Empty the wells and wash three times using at least 300 µl of Wash Buffer per well. Empty the wells and strike the plate firmly onto blotting paper.
11. Pipet 100 µl of the TMB Substrate Solution to all wells.
12. Cover the plate with a Plate Sealer, place the plate on a plate shaker set at 400-600 rpm, protect the plate from direct light and incubate for 15 ± 5 minutes at 18-28 °C.
13. Pipet 100 µl of Stop Solution to all wells. Remove air bubbles with a pipette tip. Proceed to step 14 within 30 minutes.
14. Read the absorbance at 450 nm in a microtiter plate reader.

RESULTS

Standard Curve

Record the absorbance at 450 nm for B₀, each calibrator, and blank (NSB) well. Average the values, subtract the average of the blank wells (NSB) and record averages (=corrected average absorbance). Calculate the binding (B) of each calibrator as the percentage of B₀, with the NSB-corrected absorbance of the B₀ taken as 100 %.

$$B / B_0 (\%) = \text{percent bound} = \frac{\text{net absorbance}}{\text{net absorbance of Zero Calibrator}} \times 100$$

Plot the percent bound (vertical axis) versus the concentration of Amanitin in ng/ml (horizontal axis) using a lin/log graph paper. Draw the best fitting curve or calculate the standard curve using a four parameter logistic.

Samples and Controls

Record the absorbance at 450 nm for each sample well. Average the values, subtract the average of the blank and record the averages (=corrected average absorbance). Calculate, as described above, the binding of each sample wells as a percent of B₀, with the NSB-corrected absorbance of the B₀ taken as 100%. Locate the B/B₀ value of the samples on the vertical axis, draw a horizontal line intersecting the standard curve and read the Amanitin concentration (ng/ml) from the horizontal axis.

See Table 16 and Figure 1 for examples of results and standard curves. *These results and standard curves are for demonstration purposes only. A standard curve must be generated for each set of samples to be assayed.*

Standardization: Amanitin ELISA is calibrated against α-Amanitin using UV/VIS. $\epsilon_{310} = 13'500 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ in H₂O.

QUALITY CONTROL

A thorough understanding of this package insert is necessary for the successful use of the product. Reliable results will be obtained only by using precise laboratory techniques (current GLP guidelines) and accurately following this package insert.

The reproducibility of standard curve parameters and control values should be within established limits of laboratory acceptability. The confidence limits for the Controls are lot-specific and printed on the additional QC data sheet.

If the precision of the assay does not correlate with the established limits and repetition excludes errors in technique, check the following issues: i) pipetting, temperature controlling and timing devices ii) ELISA reader settings iii) expiration dates of reagents iv) storage and

incubation conditions v) TMB Substrate Solution should be colorless vi) purity of water.

LIMITATIONS

- The reagents supplied with this kit are optimized to measure α - and γ -Amanitin in human urine, serum and plasma.
- **AMANITIN CONCENTRATIONS SHOULD BE USED AS SUPPLEMENTARY DATA TO THE PHYSICIAN FOR ESTABLISHING A DIAGNOSIS:** On the one hand, the Amanitin concentration in urine does strongly depend on the time after mushroom ingestion at which the urine from a patient was collected. On the other hand, a negative result in the ELISA does not exclude intoxication. It means only that α - and γ -Amanitin cannot be detected in the sample. Thus, each physician has to check whether the patient has consumed mushrooms a few days before symptoms occurred (3-5).

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Intra-Assay Precision (Within-Run): 6.3% (urine). The intra-assay precision was calculated from the results of 20 pairs of values from four spiked urine samples obtained in a single run. The mean values (ng/ml) are presented in Table 17.

Inter-Assay Precision (Run-to-Run): 7.3% (urine). The inter-assay precision was calculated from the results of 3 spiked urine samples obtained in 20 different runs. The mean values (ng/ml) are presented in Table 18.

Dilution Linearity/Parallelism: 97.8% (urine). Three human urine samples spiked with a high concentration of α -Amanitin was diluted (1:25 to 1:800) with Incubation Buffer and assayed according to the assay procedure. The mean values (ng/ml) are presented in Table 19.

Spiking Recovery in Urine: 99.9%. One urine sample was spiked with increasing amounts of α -Amanitin and assayed four times according to the assay procedure. The resulting mean values (ng/ml) are presented in Table 20.

Spiking Recovery in Plasma and Serum: 111.2% (plasma), 104.6% (serum). One human plasma and serum sample, each was spiked with increasing amounts of α -Amanitin and assayed according to the assay procedure. The values (ng/ml) are presented in Table 21.

Sensitivity:

Detection Limit (Limit of Quantification-LoQ): 1.5 ng/ml. The functional least detectable dose (FLDD) was calculated to be 1.5 ng/ml (cut-off of intra assay CV= 15%).

Detection Limit (Limit of Blank-LoB): 0.22 ng/ml. Twenty duplicates of Incubation Buffer were assayed in a single run. Mean and standard deviation were calculated for the absorbance values. The minimum detectable dose of Amanitin was calculated to be at 0.22 ng/ml by adding two standard deviations to the mean absorbance of the reagent blank (Incubation Buffer) and intersecting this value with the standard curve obtained in the same run.

Specificity: The following cross-reactions of the polyclonal rabbit anti- α -Amanitin antibody with different Amatoxins and Phallotoxins have been determined at 50% binding.

α -Amanitin : 100.0 % ϵ -Amanitin: 0.1 %
 β -Amanitin : 0.1 % Phalloidin: not detectable
 γ -Amanitin : 90.0 % Phallacidine: not detectable

REFERENCE INTERVALS AND INTERPRETATION OF RESULTS

75 Urine and 100 serum samples from unaffected donors were measured according to the assay procedure. The results are presented in Table 22.

In an independent study from Staack et al. (6) 100 urine samples from donors tested for drugs of abuse, were tested with the Bühlmann Amanitin ELISA. All samples were measured below the LoQ of 1.5 ng/ml (refer to Performance Characteristics).

Therefore, amanitin values in urine above the **LoQ of 1.5 ng/ml** indicate possible amanitin intoxication.

In the clinical study by Butera et al. (7) 61 samples from patients with putative amanitin intoxication were thoroughly investigated. 10 patients had confirmed amanitin intoxication. Urinary samples collected **within 36 hours** (n=6) after mushroom ingestion showed 100% sensitivity and specificity by applying a **cut-off of 5 ng/ml** (see Table 3). **Important:** The sensitivity rapidly decreases if samples are collected at a later stage (refer to Figure 2).

IMPORTANT NOTES:

- **Bühlmann strongly recommends taking these values as a guideline only.** The quantification of amanitin intoxication by ELISA must be regarded as an additional tool in an entire diagnostic work-up and must not substitute the final diagnostic decision by the responsible physician/toxicologist.
- A negative result does not exclude possible amanitin intoxication.
- To reach highest sensitivity, sample collection must be within 36 hours after mushroom ingestion.
- The Bühlmann Amanitin ELISA shows fairly no cross reactivity to β -amanitin. Therefore α - and γ -amanitin only, can be detected (see Performance Characteristics). Intoxications with β -amanitin cannot be detected.

Diagnostic Accuracy (%)	SENS	SPEZ	PPV	NPV
All patients included in the study (n=61)				
Urinary amanitin levels ≥ 1.5 ng/ml	70.0	82.4	43.8	93.3
Urinary amanitin levels ≥ 5.0 ng/ml	60.0	100.0	100.0	92.7
Patients evaluated within 36 hours (n=51)				
Urinary amanitin levels ≥ 1.5 ng/ml	100.0	87.2	50.0	100.0
Urinary amanitin levels ≥ 5.0 ng/ml	100.0	100.0	100.0	100.0

Table 3: According to Butera et al. 2004

DEUTSCH

ANWENDUNGSZWECK

Der BÜHLMANN Amanitin ELISA Test wird gebraucht für die direkte, quantitative *in vitro* diagnostische Bestimmung von α - und γ -Amanitin in humanem Urin, Serum und Plasma.

PRINZIP DER METHODE

Der BÜHLMANN Amanitin ELISA ist ein kompetitiver Immuntest. Die Mikroküvetten wurden mit einem, gegen α - und γ -Amanitin spezifischer, polyklonalen Antikörper (Ak) (1,2) beschichtet. Während der ersten Inkubation, konkurriert das im vorverdünnten Urin oder Kalibratoren vorkommende Amanitin mit Biotin-markiertem Amanitin um die Bindungsstellen des spezifischen anti-Amanitin Kaninchen Ak. Nach einem Waschschrift, wird Meerrettichperoxidase (HRP)-konjugiertes Streptavidin zugegeben, welches an die Biotin-Antikörper-Komplexe bindet. Ungebundener Enzym-Marker wird durch einen zweiten Waschschrift entfernt und die Tetramethylbenzidin (TMB)-enthaltende Substratlösung in die Küvetten pipettiert. Die darauffolgende Enzymreaktion bewirkt eine Blaufärbung. Die Reaktion wird durch Zugabe der sauren Stopplösung (Schwefelsäure - H_2SO_4) beendet und ein Farbumschlag (gelb) bewirkt. Die bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessene optische Dichte der Lösung, ist umgekehrt proportional zur Amanitin Konzentration in den Proben.

GELIEFERTE REAGENZIEN UND VORBEREITUNG

Reagenz	Inhalt	Art.-Nr.	Rekonstitution
Mikrotiter-Platte polyklonaler anti- α -Amanitin Antikörper	8 x 12 Küvetten	B-EKAM1-MP	gebrauchsfertig
Abdeckfolien	3 Stück		
Wasch-Puffer Konzentrat (10x) Konservierungsmittel	1 Flasche 100 ml	B-EKAM1-WB	mit 900 ml deionisiertem Wasser verdünnen
Inkubations-Puffer Konservierungsmittel	1 Flasche 100 ml	B-EKAM1-IB	gebrauchsfertig
Blanking-Reagenz* lyoph. Amanitin in Puffermatrix; Konservierungsmittel	1 Flasche	B-EKAM1-BR	mit 1 ml Inkubations-Puffer rekonstituieren
Kalibratoren A bis E** lyoph. α -Amanitin in einer Puffermatrix; Konservierungsmittel	5 Flaschen	B-EKAM1-CASET	mit 1 ml Inkubations-Puffer rekonstituieren
Kontrolle Niedrig / Hoch*** lyoph. Amanitin in humanem Urin	2 Flaschen	B-EKAM1-CONSET	mit 1 ml Inkubations-Puffer rekonstituieren
Biotin Konjugat Biotin-konjugiertes Amanitin in Puffermatrix; Konservierungsmittel	1 Flasche 5.5 ml	B-EKAM1-BC	gebrauchsfertig
Enzym-Marker HRP-Streptavidin in Puffermatrix; Konservierungsmittel	1 Flasche 11 ml	B-EKAM1-EL	gebrauchsfertig
TMB-Substrat Zitrat-gepufferte TMB-Lösung mit H_2O_2	1 Flasche 11 ml	B-TMB	gebrauchsfertig
Stopp-Lösung 0.25 M H_2SO_4	1 Flasche 11 ml	B-STs	gebrauchsfertig korrosiv

Table 4

* Das Nullwert-Reagenz enthält 100 μ g/ml α -Amanitin.

** Die Kalibratoren A, B, C, D und E enthalten nach der Rekonstitution 1, 3, 10, 30 und 100 ng/ml α -Amanitin.

*** Die Kontrollen enthalten Lot-spezifische α -Amanitin Mengen. Für genaue Konzentrationsangaben siehe zusätzliches QC-Datenblatt.

LAGERUNG UND HALTBARKEIT DER REAGENZIEN

Ungeöffnete Reagenzien	
Lyophilisierte Kalibratoren Kontrollen und Nullwertreagenz müssen bei -20°C gelagert werden. Die übrigen Testkomponenten sind bei 2-8°C stabil. Zu verwenden bis zum auf der Verpackungsetikette angegebenen Verfallsdatum.	
Geöffnete / rekonstituierte Reagenzien	
Mikrotiter-Platte	Ungebrauchte Streifen sofort in die mit Dessikator versetzte Packung zurückbringen. Packung völlig schließen. Bis zum Verfallsdatum bei 2-8°C haltbar.
Waschpuffer	4 Monate nach der Verdünnung bei 2-8°C lagern.
Kalibratoren	Bei -20°C lagern, bis 3 Monate haltbar
Kontrollen	
Nullwert-Reagenz	
Inkubations-Puffer	Bis zum Verfallsdatum bei 2-8°C lagern
Enzym-Marker	
Biotin-Konjugat	
TMB-Substrat	Bis zum Verfallsdatum bei 2-8°C im Dunklen lagern.
Stopp-Lösung	Bis zum Verfallsdatum bei 18-28°C lagern.

Table 5

WARNUNG UND VORSICHTSMASSNAHMEN

- **Substrat- und Stop-Lösung:** Die Substratlösung (B-TMB) enthält Tetramethylbenzidin, Wasserstoff-Peroxid und Dimethylformamide. Die Stop-Lösung (B-STs) enthält Schwefelsäure. Jeder dieser Reagenzien reizt die Augen, die Haut und die Schleimhautmembranen. Berührung mit den Augen, der Haut und die Bekleidung vermeiden. Nach Berührung sofort mit viel Wasser spülen.
- **Nullwert-Reagenz, Kalibratoren, Kontrollen und Biotin-Konjugat:** Enthalten Amanitin. Die Einnahme dieser Reagenzien vermeiden.
- Ungebrauchte Lösungen sollten gemäss der lokalen gesetzlichen Bestimmungen entsorgt werden.

TECHNISCHE VORSICHTSMASSNAHMEN

Kitkomponenten

- Auf Grund des Produktionsprozesses kann es Rückstände in den Wells der Mikrotiterplatten haben. Sie werden mit dem 1. Waschen (Schritt 2) entfernt und haben keinen Einfluß auf die Ergebnisse.
- Lesen Sie die Arbeitsanleitung sorgfältig vor der Testdurchführung. Die Testqualität kann negativ beeinflusst werden, wenn die Reagenzien nicht korrekt verdünnt oder verändert werden sowie nicht entsprechend der in dieser Anleitung angegebenen Lagerungsbedingungen gelagert werden.
- Die Reagenzien dürfen nach Ablauf des Verfallsdatums nicht mehr verwendet werden.
- Mischen Sie nicht Reagenzien verschiedener Kit lots.
- Vermeiden Sie unter allen Umständen, dass es zu einer Kontamination zwischen verschiedenen Reagenzien, Proben und zwischen den Wells kommt.
- Die Reagenzien vor Gebrauch auf Raumtemperatur äquilibrieren lassen und mischen (vortexen).
- Mikrotiterstreifen dürfen nicht wiederverwendet werden.
- Ein wiederholtes Auftauen und Einfrieren der Kitreagenzien muss vermieden werden.
- Das als Marker gebrauchte Enzym (HRP) wird durch Sauerstoff inaktiviert und ist sehr empfindlich gegen Natriumazid, Thimerosal, Hypochlorsäure und aromatischen chlorierten Kohlenwasserstoffe, die oft im Laborwasser vorkommen. Daher sollte nur deionisiertes oder destilliertes Wasser, hoher Qualität verwendet werden.
- Falls die Anfangskonzentration einer unbekannten Probe höher ist als die des höchsten Kalibrators (Kalibrator E), sollte diese Probe mit Inkubationspuffer weiter verdünnt werden und nochmals gemäss der Arbeitsanleitung

bestimmt werden. Der resultierende Verdünnungsfaktor muss in der Endkonzentrationsberechnung berücksichtigt werden.

ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL

- Präzisionspipetten mit Einwegspitzen für 40 µl, 50 µl, 100 µl und 1 ml.
- Multishot Pipetten mit Einwegspitzen für 50 µl und 100 µl.
- Polystyren oder Polypropylen Einwegröhrchen zur Vorbereitung der Verdünnungsproben.
- 1000 ml Zylinder zur Verdünnung des Waschpuffers.
- Saugfähiges Papier.
- Microtiter-Platten-Waschgerät oder Spritzflasche für Waschpuffer.
- Microtiter-Platten-Schüttler.
- Microtiter-Platten-Photometer; optischer Filter (450 nm).

UNTERSUCHUNGSMATERIAL UND LAGERUNG

- Dieser Test benötigt weniger als 50 µl Urin, Serum oder Plasma.
- Urin, Serum oder Plasma Proben sammeln und gekühlt aufbewahren. Die Proben können bis zu 7 Tagen bei 2-8°C gelagert werden. Für eine längere Lagerung können die Proben bei -20°C für mindestens 6 Monate aufbewahrt werden.
- Um die höchstmögliche Sensitivität zu erreichen muß die Probensammlung innerhalb von 36 Stunden nach der Pilmahlzeit erfolgen (siehe Kapitel „Normalwerte und Interpretation der Resultate“).

ARBEITSANLEITUNG

1. Patientenproben mit Inkubationspuffer 1:25 verdünnen (z.B. 40 µl Harn + 960 µl Inkubationspuffer).
2. Eine Mikrotiter-Platte mit ausreichenden Streifen für das Testen der gewünschten Kalibratoren, Kontrollen und Proben vorbereiten. Ungebrauchte Streifen vom Halter entfernen und **unverzüglich** mit dem Dessikator einpacken und gekühlt lagern.
Wichtig: Die Kit-Reagenzien vor Gebrauch auf Raumtemperatur (18-28°C) bringen.
3. Mikroküvetten zweimal mit jeweils ≥ 300 µl Waschpuffer waschen. Waschpuffer dekantieren und Platte durch Ausschlagen auf saugfähigem Papier sorgfältig trocknen.
- 4a. Zweimal 50 µl Nullwert-Reagenz (Blank) in die Mikroküvetten A1 und A2 pipettieren.
Zweimal 50 µl Inkubationspuffer (Null-Kalibrator) in die Mikroküvetten B1 und B2 pipettieren.
Zweimal 50 µl Kalibrator A in die Mikroküvetten C1 und C2 pipettieren.
Zweimal 50 µl Kalibrator B in die Mikroküvetten D1 und D2 pipettieren.
Zweimal 50 µl Kalibrator C in die Mikroküvetten E1 und E2 pipettieren.
Zweimal 50 µl Kalibrator D in die Mikroküvetten F1 und F2 pipettieren.
Zweimal 50 µl Kalibrator E in die Mikroküvetten G1 und G2 pipettieren.
- 4b. Zweimal 50 µl Kontrolle Tief in die Mikroküvetten H1 und H2 pipettieren.
Zweimal 50 µl Kontrolle Hoch in die Mikroküvetten A3 und A4 pipettieren.
- 4c. Zweimal 50 µl der verdünnten Serumproben (1:25) in die nächsten Mikroküvetten pipettieren.
5. 50 µl Biotin-Konjugat zu allen Mikroküvetten pipettieren.
6. Mikrotiter-Platte mit einer Abdeckfolie abdecken und 30 ± 5 Minuten bei 18-28°C auf einem Mikrotiter-Platten-Schüttler bei 400-600 rpm inkubieren.
7. Abdeckfolie entsorgen, die Mikroküvetten entleeren und je dreimal mit jeweils ≥ 300 µl Waschpuffer waschen. Platte durch Ausschlagen auf saugfähigem Papier sorgfältig trocknen.
8. 100 µl Enzymkonjugatlösung zu jeder Mikroküvette zugeben.
9. Mikrotiter-Platte mit einer Abdeckfolie abdecken und 15 ± 5 Minuten bei 18-28°C auf einem Mikrotiter-Platten-Schüttler bei 400-600 rpm inkubieren.
10. Abdeckfolie entsorgen, die Mikroküvetten entleeren und dreimal mit jeweils ≥ 300 µl Waschpuffer waschen. Platte durch Ausschlagen auf saugfähigem Papier sorgfältig trocknen.
11. 100 µl TMB-Substrat zu jeder Mikroküvette zugeben.
12. Mikrotiter-Platte mit Abdeckfolie abdecken und 15 ± 5 Minuten bei 18-28°C auf einem Mikroplatten-Schüttler bei 400-600 rpm inkubieren. Platte vor direktem Licht schützen.
13. 100 µl Stopp-Lösung zu jeder Mikroküvette zugeben und allfällige Luftblässchen mit Pipettenspitzen entfernen.
14. Optische Dichte bei 450 nm innerhalb der nächsten 30 Minuten messen.

Eichkurve

Optische Dichte aller mit Kalibrator oder Nullwert-Reagenz (NSB) gefüllten Mikroküvetten bei 450 nm messen. Zur Ermittlung der „korrigierten Absorptionsmittelwerte“ wird der Mittelwert berechnet und der Mittelwert des Blanking Reagenzes (NSB) vom Mittelwert der Kalibratoren subtrahiert. Die Bindung (B) jedes Kalibrators wird als Prozentsatz von B_0 berechnet, wobei die NSB-korrigierte Absorption des B_0 als 100% gesetzt wird.

$$B / B_0 (\%) = \% \text{ Bindung} = \frac{\text{netto Absorption}}{\text{netto Absorption des Null - Kalibrators}} \times 100$$

Die Bindung B/B_0 (Vertikalachse) wird gegen die Amanitin-Konzentration in ng/ml (Horizontalachse) auf einem semi-logarithmischen (lin/log) Papier aufgetragen. Optimale „best fitting curve“ Eichkurve zeichnen oder mit einem sog. 4 Parameter Algorithmus berechnen.

Proben und Kontrollen

Die optische Dichte (OD) der Proben und Kontrollen wird bei 450 nm gemessen. Zur Ermittlung der „Netto Absorptionsmittelwerte“ wird der Mittelwert berechnet und der OD-Mittelwert des Blanking Reagenzes (NSB) vom Mittelwert der Proben und Kontrollen subtrahiert. Danach wird die Bindung jeder Probe als Prozentsatz von B_0 berechnet, wobei die NSB-korrigierte Absorption von B_0 als 100% gesetzt wird. Die B/B_0 -Werte der Proben und Kontrollen werden auf der Eichkurve aufgetragen und die entsprechenden Amanitin-Konzentrationen in ng/ml aus der X-Achse abgelesen.

Für ein Beispiel von Resultaten und Eichkurve siehe Table 16 und Figure 1. *Diese Daten dienen nur der Illustration und sind nicht dazu bestimmt, die Ergebnisse eines anderen Testenansatzes danach zu berechnen. Eine Eichkurve muss für jeden Probenansatz jeweils neu ermittelt werden.*

Standardisierung: Amanitin ELISA ist gegen α -Amanitin unter Verwendung von UV/VIS kalibriert. $\epsilon_{310} = 13.500 \text{ M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ in H_2O .

QUALITÄTSKONTROLLE

Ein vollständiges Verständnis dieser Testpackungsbeilage ist für den erfolgreichen Gebrauch des Produktes notwendig. Zuverlässige Resultate werden nur erreicht bei Anwendung „Guter Laborpraxis“ (aktuelle GLP Richtlinien) und die Einhaltung der Arbeitsanleitung.

Die Reproduzierbarkeit der Eichkurvenparameter und der Kontrollwerte sollte innerhalb des vom Labor etablierten Erwartungsbereiches liegen. Die Vertrauensbereiche der Kontrollen sind Lot-spezifisch und sind auf dem zusätzlichen QC-Datenblatt angegeben. Falls die Präzision des Testes nicht mit dem etablierten Erwartungsbereich übereinstimmt und wiederholte Messungen ein technisches Problem ausschliessen, sind folgende Bedingungen zu überprüfen: i) Pipettierung, Temperatur- und Zeitmessende Geräte, ii) Photometer Eichung, iii) Verfallsdaten der Reagenzien, iv) Lagerung- und Inkubations-Bedingungen, v) die TMB Substratlösung sollte farblos sein, vi) Wasserreinheit.

EINSCHRÄNKUNG

- Die mit dem Kit gelieferten Reagenzien wurden zur Messung von α - und γ -Amanitin im humanem Urin, Serum und Plasma optimiert.
- AMANITIN KONZENTRATIONEN SOLLTEN DEM ARZT NUR ALS ZUSÄTZLICHE INFORMATIONSQUELLE ZUR DIAGNOSESTELLUNG DIENEN: Die Amanitin-Konzentration im Urin hängt einerseits stark von dem Zeitpunkt der Probennahme beim Patienten ab. Andererseits bedeutet ein negatives Resultat nicht automatisch, dass eine Vergiftung ausgeschlossen werden kann. Es bedeutet nur, dass zum Zeitpunkt der Probennahme kein α - oder γ -Amanitin nachgewiesen werden kann. Darum muss der Arzt genau abklären, ob der Patient in den letzten Tagen vor dem Auftreten der Symptome Pilze gegessen hat (3-5).

LEISTUNGSMERKMALE

Intra-Assay Präzision (Within-Run): 6.3 % (Urin). Die Intra-Assay Präzision wurde bestimmt durch die 20-fache Doppelmessung von vier, mit zusätzlichem Amanitin versetzten (spiked) Proben im gleichen Ansatz. Die erhaltenen Mittelwerte sind in Table 17 in ng/ml angegeben.

Inter-Assay Präzision (Run-to-Run): 7.3 % (Urin). Die Inter-Assay Präzision wurde bestimmt durch die 3-fache Doppelmessung von vier, mit zusätzlichem Amanitin versetzten, Proben in 20 verschiedenen Ansätzen. Die erhaltenen Mittelwerte sind in Table 18 in ng/ml angegeben.

Verdünnungslinearität: 97.8%. Drei, mit zusätzlichem Amanitin versetzte Urinproben wurden mit Inkubations-Puffer verdünnt (1:25 bis 1:800) und danach gemäss der Arbeitsanleitung getestet. Die erhaltenen Mittelwerte sind in Table 19 in ng/ml angegeben.

Wiederfindung im Urin: 99.9 %. Eine Urinprobe wurde mit steigenden α -Amanitin Mengen versetzt und danach entsprechend der Arbeitsanleitung gemessen. Die Resultate sind in Table 19 in ng/ml angegeben.

Wiederfindung im Plasma und Serum: Je eine Serum- und Plasma-Probe wurden mit steigenden α -Amanitin Mengen versetzt und danach entsprechend der Arbeitsanleitung gemessen. Die Resultate sind in Table 21 in ng/ml angegeben.

Sensitivität:

Nachweisgrenze (LoQ): Der „Limit of Quantification“ des Tests wurde als 1.5 ng/ml bestimmt (Grenzwert des Intra-Assay CV's = 15%).

Nachweisgrenze (LoB): 0.22 ng/ml. Zwanzig Doppelansätze mit Inkubations-Puffer wurden gleichzeitig angesetzt. Mittelwert und Standardabweichung wurden für die Absorptionswerte berechnet. Die kleinste nachweisbare Amanitin-Menge wurde durch Addition von zwei Standardabweichungen zum Absorptionsmittelwert berechnet. Die Intersektion dieses Wertes mit der Standardkurve ergab einen Wert von 0.22 ng/ml.

Spezifität: Die folgenden Kreuzreaktionen zwischen dem polyklonalen anti- α -Amanitin Kaninchen-Antikörper und verschiedenen Amatoxinen und Phallotoxinen wurden bei 50% Bindung bestimmt.

α -Amanitin : 100.0 % ε -Amanitin : 0.1 %
 β -Amanitin : 0.1 % Phalloidin: not detectable
 γ -Amanitin : 90.0 % Phallacidine: not detectable

REFERENZINTERVALLE UND INTERPRETATION DER RESULTATE

75 Urin und 100 Serum Proben von Normal Spendern wurden entsprechend der Arbeitsanleitung gemessen. Die Resultate sind in Table 22 dargestellt.

In einer unabhängigen Studie von Staak et al. (6) wurden 100 Urinproben von Spendern welche auf Drogenmißbrauch getestet wurden zusätzlich mit dem Bühlmann Amanitin ELISA getestet. Alle Proben waren unterhalb der Nachweisgrenze von 1.5 ng/ml (siehe Leistungsmerkmale).

Somit zeigen Amanitinwerte in Urin, welche größer als die **Nachweisgrenze von 1.5 ng/ml** sind, eine mögliche Amanitin Vergiftung an.

In der klinischen Studie von Butera et al. (7) wurden 61 Proben von Patienten mit einer vermuteten Amanitin Vergiftung genau untersucht. 10 Patienten hatten eine klinisch bestätigte Amanitin Vergiftung. Urinproben welche innerhalb von 36 Stunden (n=6) nach der Pilzeinnahme gesammelt wurden zeigten eine Sensitivität und Spezifität von 100%. Dabei wurde ein **Grenzwert von 5 ng/ml** (siehe Table 6) angewandt. **Wichtig:** Die Sensitivität sinkt stark ab, falls die Proben zu einem späteren Zeitpunkt gesammelt werden (siehe Figure 2; *Entnahmezeit-abhängige Amanitin Werte der Studienpopulation (n=61). In 20 Fällen überlappen die Amanitin Werte die sichtbaren Symbole (Werte tiefer 1.5 ng/ml in Urinproben, welche zwischen 6 und 24 Stunden nach der Pilzmahlzeit gesammelt wurden). Volle Symbole zeigen Amatoxin vergiftete Patienten (n=10), leere Symbole Patienten mit anderer Diagnose (n=51). Quadrate zeigen Fälle von dokumentierter Hepatitis oder Leberschaden (n=8).*

WICHTIGE HINWEISE:

- **Bühlmann weist darauf hin, daß diese Werte nur als Richtlinie angesehen werden können.** Die Quantifizierung einer Amanitin Vergiftung mittels ELISA darf nur als zusätzliches Hilfsmittel für eine vollständige klinische Diagnose betrachtet werden und kann nicht die endgültige diagnostische Entscheidung des verantwortlichen Arztes/Toxikologen abnehmen.
- Ein negatives Resultat schließt eine Amanitin Vergiftung nicht aus.
- Um die höchstmögliche Sensitivität zu erreichen muß die Probensammlung innerhalb von 36 Stunden nach der Pilzmahlzeit erfolgen.
- Der Bühlmann Amanitin ELISA zeigt praktisch keine Kreuzreaktivität zu β -Amanitin. Somit können nur α - und γ -Amanitin nachgewiesen werden (siehe

Leistungsmerkmale). β -Amanitin kann nicht nachgewiesen werden.

Diagnostische Genauigkeit (%)	SENS	SPEZ	PPV	NPV
alle Patienten der Studie (n=61)				
Amanitin Wert im Urin ≥ 1.5 ng/ml	70.0	82.4	43.8	93.3
Amanitin Wert im Urin ≥ 5.0 ng/ml	60.0	100.0	100.0	92.7
Patienten innerhalb von 36 Stunden getestet (n=51)				
Amanitin Wert im Urin ≥ 1.5 ng/ml	100.0	87.2	50.0	100.0
Amanitin Wert im Urin ≥ 5.0 ng/ml	100.0	100.0	100.0	100.0

Table 6: Nach Butera et al. 2004 (7)

DOMAINE D'UTILISATION

La trousse BÜHLMANN Amanitine ELISA a été conçue pour la détermination diagnostique directe et quantitative *in vitro* de l' α - ou γ -amanitine présente dans l'urine, le sérum ou le plasma humains.

PRINCIPE DU DOSAGE

Le test de dosage BÜHLMANN Amanitine ELISA est un test immunologique compétitif. Un anticorps (Ac) polyclonal spécifique à l' α - et γ -amanitine (1,2) a été coâté sur une microplaque. Au cours de la première incubation, l'amanitine présente dans les échantillons d'urine ainsi que dans les calibrateurs est en compétition avec l'amanitine marquée à la biotine pour les sites de liaison de l'anticorps de lapin anti-amanitine spécifique. Après un premier lavage, la peroxydase de raifort (HRP) conjuguée à la streptavidine est ajoutée et se lie au complexe biotine-anticorps au cours d'une deuxième incubation. Le marqueur enzymatique non lié est éliminé par un deuxième lavage et la solution substrat de tétraméthylbenzidine (TMB) est ajoutée dans les puits. Lors d'une troisième incubation, une coloration bleue se développe. Son intensité est inversement proportionnelle à la quantité d'amanitine présente dans l'échantillon. La réaction est terminée par l'addition d'une solution stop acide (H_2SO_4) qui provoque un changement de couleur du bleu au jaune. Le taux d'amanitine est déterminé par la mesure de l'absorbance à 450 nm à l'aide d'un lecteur de microplaques.

REACTIFS FOURNIS ET PREPARATION

Réactifs	Quantité	Code	Reconstitution
Microplaque coâtée d'un Ac polyclonal anti- α -amanitine	12 x 8 puits	B-EKAM1-MP	Prête à l'emploi
Films adhésifs	3 pièces		
Tampon de lavage concentré (10x) avec conservateurs	1 flacon 100 ml	B-EKAM1-WB	A reconstituer avec 900 ml d'eau déionisée
Tampon d'incubation avec conservateurs	1 flacon 100 ml	B-EKAM1-IB	Prêt à l'emploi
Réactif blanc^{*)} amanitine lyophilisée en tampon ; conservateurs	1 flacon	B-EKAM1-BR	A reconstituer avec 1 ml de tampon d'incubation
Calibrateurs A-E^{**)} α -amanitine lyophilisée tamponnée ; conservateurs	5 flacons	B-EKAM1-CASET	A reconstituer avec 1 ml de tampon d'incubation
Contrôles bas / élevé^{***)} amanitine lyophilisée dans de l'urine humaine	2 flacons	B-EKAM1-CONSET	A reconstituer avec 1 ml de tampon d'incubation
Conjugué Biotine amanitine conjuguée à la biotine + tampon avec conservateur	1 flacon 5.5 ml	B-EKAM1-BC	Prêt à l'emploi
Marqueur enzymatique streptavidine-HRP conjugué + tampon protéique et conservateurs	1 flacon 11 ml	B-EKAM1-EL	Prêt à l'emploi
Substrat TMB TMB + tampon citrate avec H_2O_2	1 flacon 11 ml	B-TMB	Prêt à l'emploi
Solution stop acide sulfurique 0.25 M	1 flacon 11 ml	B-STTS	Prête à l'emploi Corrosif

Table 7

^{*)} Le Réactif blanc contient 100 μ g/ml α -amanitine.

^{**)} Après reconstitution, les calibrateurs A, B, C, D et E contiennent respectivement 1, 3, 10, 30, et 100 ng/ml d' α -amanitine.

^{***)} Les contrôles contiennent des quantités d' α -amanitine spécifiques à chaque lot. Pour les concentrations exactes, il convient de se référer aux limites de confiance communiquées avec chaque lot de production.

STOCKAGE ET PEREMPTION DES REACTIFS

Réactifs non ouverts	
Les calibrateurs, contrôles et le réactif blanc lyophilisés doivent être conservés à -20°C. Les autres réactifs non ouverts de la trousse sont stables à 2-8°C. Ne pas utiliser après la date de péremption.	
Réactifs ouverts / Reconstitués	
Microplaque	Remplacer immédiatement les barrettes de 8 puits non utilisées dans la pochette contenant le dessiccateur puis la refermer soigneusement. Se conserve à 2-8°C durant 2 mois.
Tampon de lavage dilué	Stable durant 4 mois à 2-8°C après dilution.
Calibrateurs	Stables à -20°C durant 3 mois.
Contrôles	
Réactif Blanc	
Tampon d'incubation	Stables à 2-8°C jusqu'à la date de péremption.
Conjugué biotine	
Marqueurs enzymatiques	
Substrat TMB	Stable à 2-8°C jusqu'à la date de péremption. A protéger de la lumière
Solution stop	Stable à 18-28°C jusqu'à la date de péremption.

Table 8

- **Substrat et Solution Stop:** Le Substrat (B-TMB) contient du tétraméthylbenzidine (TMB), du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et du diméthylfomamide. La Solution stop (B-STTS) contient de l'acide sulfurique. Ces substances irritent les yeux, la peau ainsi que les muqueuses. Eviter par conséquent tout contact avec les yeux, la peau et les habits. En cas de contact accidentel avec les yeux ou la peau, il faut impérativement rincer à grande eau.
- **Réactif blanc, calibrateurs, contrôles et conjugué biotine :** contiennent de l'amanitine. Eviter l'ingestion des réactifs.
- Pour en savoir plus sur les précautions pour la manipulation et l'élimination des réactifs du kit, nous vous recommandons fortement de consulter l'organisme réglementaire compétent pour votre pays.

PRÉCAUTIONS TECHNIQUES

Réactifs

- **Les puits de la microplaque** peuvent être recouverts de **résidus** formés lors du processus de production. Ils sont éliminés par le lavage (voir l'étape 3 de la procédure) et n'ont aucune influence sur les résultats.
- Lire attentivement les instructions avant de réaliser le test. Le test ne donnera pas les résultats escomptés en cas de dilution incorrecte ou de modification des réactifs, ou de stockage dans des conditions autres que celles détaillées dans le présent mode d'emploi.
- Les composants ne doivent pas être utilisés au-delà de la date d'expiration imprimée sur les étiquettes.
- Ne pas mélanger des réactifs de lots différents.
- Laisser les réactifs équilibrer à la température ambiante. Reconstituer les réactifs lyophilisés comme indiqué. Bien mélanger (au vortex) les réactifs avant utilisation.
- Les micropuits sont à usage unique.
- Eviter les cycles de congélation/décongélation des réactifs fournis.
- L'enzyme (HRP) utilisé comme marqueur est inactivé par l'oxygène et est hautement sensible à l'azoteure de sodium, au thimérosol, à l'acide hypochlorique, ainsi qu'aux hydrocarbures chlorés fréquemment présents dans l'eau utilisée en laboratoire. N'utiliser par conséquent que de l'eau déionisée ou distillée de haute qualité.
- Si la concentration initiale d'un échantillon présente un signal plus élevé que le calibrateur le plus haut (calibrateur E), l'échantillon doit être dilué à l'aide de tampon d'incubation et dosé à nouveau selon la procédure.

standard. Le facteur de dilution doit être pris en compte lors du calcul de la concentration finale.

MATERIEL REQUIS MAIS NON FOURNI

- Pipettes de précision réglables avec pointes jetables pour 40 µl, 50 µl, 100 µl et 1 ml.
- Multipipettes avec pointes jetable pour 50 et 100 µl.
- Tubes jetables en polypropylène ou polystyrène pour la préparation des dilutions d'échantillons.
- Eprouvette graduée de 1000 ml pour la préparation du tampon de lavage.
- Laveur automatique de microplaques ou pissette pour le tampon de lavage.
- Papier absorbant.
- Agitateur de microplaques.
- Lecteur de microplaques pour la mesure de l'absorbance à 450 nm.

PRELEVEMENT, PREPARATION ET CONSERVATION DES ECHANTILLONS

- La procédure requiert moins de 50 µl d'urine, de sérum ou de plasma.
- Recueillir l'urine, le sérum ou le plasma chez le patient et maintenir l'échantillon réfrigéré. Des aliquots peuvent être conservés 7 jours à 2-8°C ou durant 6 mois, congelés à -20°C.
- Pour atteindre la sensibilité la plus élevée, les échantillons doivent être collectés durant les 36 heures après ingestion des champignons (voir « Intervale de Référence et interprétation des résultats »).

PROCEDURE

1. Diluer au 1:25 tous les échantillons avec le tampon d'incubation (par ex., 40 µl d'urine + 960 µl de tampon d'incubation).
2. Préparer une microplaque avec suffisamment de puits pour recevoir tous les contrôles et échantillons nécessaires. Retirer les barrettes en trop du support et les remettre immédiatement au froid dans la pochette prévue à cet effet et contenant le dessiccateur.
Important: Porter les réactifs à 18-28°C avant de procéder au test.
3. Laver deux fois chaque puits avec au moins 300 µl de tampon de lavage. Vider les puits et les sécher en tapant fermement la microplaque sur du papier absorbant.
- 4a. Distribuer 50 µl de réactif blanc en double dans les puits A1 et A2 en tant que blanc.
Distribuer 50 µl de tampon d'incubation (calibrateur zéro) en double dans les puits B1 et B2.
Distribuer 50 µl de calibrateur A en double dans les puits C1 et C2.
Distribuer 50 µl de calibrateur B en double dans les puits D1 et D2.
Distribuer 50 µl de calibrateur C en double dans les puits E1 et E2.
Distribuer 50 µl de calibrateur D en double dans les puits F1 et F2.
Distribuer 50 µl de calibrateur E en double dans les puits G1 et G2.
- 4b. Distribuer 50 µl de contrôle bas en double dans les puits H1 et H2.
Distribuer 50 µl de contrôle élevé en double dans les puits A3 et A4.
- 4c. Distribuer 50 µl de chaque échantillon dilué (au 1:25), en double, dans les puits suivants.
5. Distribuer 50 µl de conjugué biotine dans chaque puits.

6. Couvrir la microplaque à l'aide d'un film adhésif fourni et incubé à 18-28°C pendant 30 ± 5 minutes sur un agitateur de microplaques à 400-600 rpm.
7. Retirer et jeter le film adhésif. Vider puis laver trois fois chacun des puits avec au moins 300 µl de Tampon de lavage. Vider les puits et les sécher en frappant sèchement la microplaque sur du papier absorbant.
8. Ajouter 100 µl de Marqueur enzymatique dans tous les puits.
9. Recouvrir la microplaque avec un nouveau film adhésif et incubé à 18-28°C pendant 15 ± 5 minutes sur un agitateur de microplaques à 400-600 rpm.
10. Retirer et jeter le film adhésif. Vider puis laver trois fois chaque puits avec au moins 300 µl de tampon de lavage. Vider les puits et les sécher en tapant fermement la microplaque sur du papier absorbant.
11. Ajouter 100 µl de substrat TMB dans chaque puits.
12. Recouvrir la microplaque avec un nouveau film adhésif et incubé sur l'agitateur à 400-600 rpm pendant 15 ± 5 minutes à 18-28°C. Protéger la microplaque de la lumière directe.
13. Ajouter 100 µl de solution stop à chaque puits. Eliminer les bulles d'air à l'aide d'une pointe de pipette. Passer à l'étape 14 au cours des 30 minutes suivantes.
14. Lire l'absorbance à 450 nm à l'aide d'un lecteur de microplaques.

RESULTATS

Courbe d'étalonnage

Mesurer l'absorbance à 450 nm des puits contenant B₀, les calibrateurs et le réactif blanc (NSB). Calculer la moyenne d'absorbance obtenues, soustraire la moyenne des blancs (NSB) et enregistrer les valeurs d'absorption moyenne nette. Calculer la liaison (B) en pourcentage du B₀ pour chaque calibrateur en fixant l'absorbance NSB-corrigée du B₀ à 100%.

$$B / B_0 (\%) = \% \text{ de liaison} = \frac{\text{absorbance nette}}{\text{absorbance nette du Calibrateur Zéro}} \times 100$$

Reporter le pourcentage de liaison (axe vertical) contre la concentration d' α-amanitine en ng/ml (axe horizontal) sur un papier à quadrillage semi-logarithmique (lin/log). Tracer la courbe d'étalonnage ou la calculer au moyen d'un algorithme de régression (4 parameter logistics).

Echantillons

Mesurer l'absorbance à 450 nm de chaque échantillon. Calculer la moyenne des deux valeurs obtenues, soustraire la moyenne des blancs et enregistrer les valeurs d'absorption moyenne nette. Calculer le pourcentage de liaison par rapport au B₀ comme décrit plus haut, en fixant l'absorbance NSB-corrigée du B₀ à 100%. Reporter le rapport B/B₀ sur la courbe d'étalonnage et lire la concentration d'amanitine correspondante (en ng/ml) sur l'axe horizontal.

Voir Table 16 et Figure 1 pour des exemples de résultats et de courbes d'étalonnage obtenus. *Ces résultats et courbes d'étalonnage sont donnés à titre d'exemple uniquement. Une courbe d'étalonnage doit être déterminée pour chaque série d'échantillons à doser.*

Standardisation : Amanitine ELISA est calibré contre α-Amanitine avec UV/VIS. $\epsilon_{310} = 13500 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ in H₂O.

CONTROLE DE QUALITE

Une lecture exhaustive de ce manuel est recommandée pour l'utilisation correcte de ce produit. Des résultats fiables ne seront obtenus que par un travail en laboratoire précis (bonnes pratiques de laboratoire usuelles) et en suivant fidèlement les recommandations de cette brochure. Tous les contrôles doivent avoir une valeur comprise entre les limites de confiance établies. Les limites de confiance des contrôles sont spécifiques à chaque lot et sont indiquées sur la feuille de contrôle contenue dans chaque trousse.

La reproductibilité des paramètres de la courbe d'étalonnage ainsi que des valeurs des contrôles devrait être comprise dans le domaine des valeurs attendues établies par chaque laboratoire. Si la précision des mesures ne correspond pas aux limites établies et que les répétitions excluent toute erreur technique, il est recommandé de contrôler les paramètres suivants: i) pipetage, appareils de mesure de température et de temps, ii) calibrage des instruments, iii) date de péremption des réactifs, iv) conditions de stockage et d'incubation, v) le Substrat TMB devrait être incolore, vi) pureté de l'eau.

LIMITATIONS

- Les réactifs fournis avec cette trousse ont été optimisés pour le dosage de l' α - et γ -amanitine dans l'urine, sérum et plasma humain.
- LES TAUX D'AMANITINE DEVRAIENT ETRE UTILISES COMME DONNEE SUPPLEMENTAIRE A L'ETABLISSEMENT D'UN DIAGNOSTIQUE PAR LE MEDECIN. la concentration d'amanitine dans l'urine dépend fortement de quand l'échantillon d'urine a été prélevé du patient. D'autre part, un résultat négatif du test ELISA ne signifie pas automatiquement qu'il n'y a pas eu intoxication. Cela signifie seulement qu'aucune α -amanitine (ni γ -amanitine) n'a été détectée. Pour cette raison, le médecin doit savoir précisément si le patient a mangé des champignons durant les derniers jours ou non (3-5).

CARACTERISTIQUES DE PERFORMANCE

Précision intra-essai : 6.3% (urine). Elle a été calculée à partir des mesures de 20 échantillons d'urine analysés en double dans un seul et même essai. Les résultats obtenus sont indiqués en Table 17.

Précision inter-essai : 7.3% (urine). Elle a été calculée à partir des résultats de 3 échantillons d'urine analysés en double dans 20 essais différents. Les résultats obtenus sont indiqués en Table 18.

Parallélisme/linéarité de dilution : 97.8% (urine). De l'urine humaine additionnée d' α -amanitine à une concentration élevée a été diluée (1:25 à 1:800) avec le tampon d'incubation et mesuré selon le protocole standard. Les résultats obtenus sont indiqués en Table 19.

Test de récupération dans l'urine : 99.9%. Un échantillon d'urine humaine a été additionné de quantités croissantes d' α -amanitine puis dosé selon le protocole standard. Les résultats obtenus sont indiqués en Table 20.

Test de récupération dans le plasma et le sérum : 111.2% (plasma), 104% (serum). Un échantillon de plasma et de sérum ont été additionnés de quantités croissantes d' α -amanitine puis dosés selon le protocole standard. Les résultats obtenus sont indiqués en ng/ml – voir sous Table 21.

Sensibilité

Limite de Détection (LoQ) : 1.6 – 20.5 pg/ml. La limite de quantification de cet essai a été déterminée à 1.5 ng/ml (cut-off du CV intra-essai = 15%).

Limite de Détection (LoB) : 0.22 ng/ml. Vingt duplicata du tampon d'incubation ont été dosés lors d'un seul et même essai. La moyenne et l'écart type des valeurs d'absorbance ont été calculés. La dose minimale détectable d'amanitine a été définie à 0.22 ng/ml en additionnant 2 écarts types à l'absorbance moyenne du blanc (tampon d'incubation) puis en déterminant le titre correspondant à cette valeur d'absorbance à l'aide de la courbe d'étalonnage obtenue lors du même essai.

Spécificité :

Les réactions croisées suivantes de l'anticorps de lapin anti- α -amanitine avec différentes amatoxines et phallatoxines ont été déterminées à 50% de liaison.

α -Amanitine : 100.0 %	ϵ -Amanitine: 0.1 %
β -Amanitine : 0.1 %	Phalloïdine: non détectable
γ -Amanitine : 90.0 %	Phallacidine: non détectable

INTERVALE DE REFERENCE ET INTERPRETATION DES RESULTATS

75 échantillons d'urine, et 100 de sérum de donneurs sains ont été mesurés selon la procédure. Les résultats sont présentés sous la Table 22.

Dans une étude indépendante de Staack et al. (6), 100 échantillons d'urine de donneurs testés pour abus de drogues ont été testés par l'ELISA amanitine de Bühlmann. Tous les échantillons mesurés ont des valeurs inférieures al **LoQ de 1.5 ng/ml** (voir Caractéristiques de Performance).

Donc, les valeurs de l'amanite dans l'urine supérieures al **LoQ de 1.5 ng/ml** indiquent une intoxication possible à l'amanitine.

Dans l'étude clinique de Butera et al. (7), 61 échantillons de patients susceptibles d'être intoxiqués par l'amanitine ont été sérieusement analysés. Une intoxication à l'amanitine a été cliniquement confirmée pour 10 patients. Les échantillons d'urine collectés **durant les 36 heures** (n=6) après ingestion des champignons ont montré une sensibilité et une spécificité de 100% en appliquant un **cut-off of 5 ng/ml** (voir Table 9). **Important:** La sensibilité décroît rapidement si les échantillons sont collectés à une étape ultérieure (voir Figure 2; *Taux d'amanitine dans l'urine de la population étudiée en fonction du temps (n=61). Dans 20 cas, les taux d'amanitine se superposent aux symboles visibles (valeurs inférieures à 1.5 ng/ml dans les échantillons d'urine collectés 6 à 24 heures après ingestion des champignons). Les symboles fermés indiquent les patients empoisonnés à l'amanitine (n=10), les symboles ouverts indiquent les patients avec un autre diagnostic (n=51). Les carrés indiquent les cas documentés d'hépatite aiguë ou d'affections hépatiques (n=8).*

NOTES IMPORTANTES:

- **Bühlmann recommande fortement de considérer ces données comme une indication seulement.** La quantification de l'intoxication à l'amanitine par le test ELISA doit être considérée comme un outil supplémentaire dans un diagnostic complet et ne doit pas être substituée à la décision du diagnostic final par le médecin/toxicologue responsable.
- Un résultat négatif ne doit pas exclure une intoxication possible à l'amanitine.
- Pour atteindre la sensibilité la plus élevée, les échantillons doivent être collectés durant les 36 heures après ingestion des champignons.

- Le test ELISA de l'amanitine de Bühlmann ne montre pas de réactivité croisée avec la β -amanitine. De ce fait, seules les α - et γ -amanitines peuvent être détectées (voir Caractéristiques de Performance). Les intoxications à la β -amanitine ne peuvent être détectées.

Précision du diagnostic (%)	SENS	SPEZ	PPV	NPV
Tous les patients sont inclus dans l'étude (n=61)				
Taux d'amanitine dans l'urine ≥ 1.5 ng/ml	70.0	82.4	43.8	93.3
Taux d'amanitine dans l'urine ≥ 5.0 ng/ml	60.0	100.0	100.0	92.7
Patients évalués durant 36 heures (n=51)				
Taux d'amanitine dans l'urine ≥ 1.5 ng/ml	100.0	87.2	50.0	100.0
Taux d'amanitine dans l'urine ≥ 5.0 ng/ml	100.0	100.0	100.0	100.0

Table 9 d'après Butera et al. 2004 (7)

ITALIANO

USO

Il kit BÜHLMANN Amanitina ELISA è da utilizzarsi per la determinazione diagnostica in vitro diretta e quantitativa dell' α -e γ -Amanitina presente nell'urina, nel siero e nel plasma umano.

PRINCIPIO DEL DOSAGGIO

Il dosaggio BÜHLMANN Amanitina ELISA è un immunodosaggio competitivo. Un anticorpo policlonale (Ab) specifico per l' α - e γ -Amanitina (1,2) è stato coattato nei pozzetti della micropiastra. Durante la prima incubazione, l'amanitina presente rispettivamente nei campioni di urina prediluita e nei calibratori, compete con l'Amanitina biotinilata per i siti leganti dell'anticorpo specifico di coniglio anti-Amanitina. Dopo lavaggio, viene aggiunta streptavidina coniugata con perossidasi di rafano (HRP), che si lega durante una seconda incubazione ai complessi Biotina-Anticorpo. L'enzima marcato non legato viene rimosso attraverso un secondo lavaggio ed ai pozzetti viene aggiunta Substrato TMB contenente tetrametilbenzidina (TMB). Durante l'incubazione successiva, avviene la formazione di un prodotto colorato inversamente proporzionale alla quantità di Amanitina presente nel campione. Dopo l'aggiunta di soluzione bloccante acida il colore cambia da blu a giallo e può essere misurato a 450 nm.

REAGENTI FORNITI E LORO PREPARAZIONE

Reagenti	Quantità	Codice	Ricostituzione
Micropiastra Precoattata con un anticorpo policlonale anti- α -Amanitina	12 x 8 pozzetti	B-EKAM1-MP	Pronta all'uso
Foglio per sigillare la piastra	3 fogli		
Tampone di lavaggio Concentrato (10x) Con conservanti	1 flacone 100 ml	B-EKAM1-WB	Diluire con 900 ml di acqua deionizzata
Tampone di incubazione Con conservanti	1 flacone 100 ml	B-EKAM1-IB	Pronto all'uso
Reagente Bianco^{*)} Amanitina liofila in un tampone/matrice con conservanti	1 flacone	B-EKAM1-BR	Aggiungere 1 ml di tampone di incubazione
Calibratori da A ad E ^{**)} α -Amanitina liofila in una matrice/tampone con conservanti	5 flaconi	B-EKAM1-CASET	Aggiungere 1 ml di tampone di incubazione
Controllo basso/ alto ^{***)} Amanitina liofila con urina umana	2 flaconi	B-EKAM1-CONSET	Aggiungere 1 ml di tampone di incubazione
Coniugato biotinilato Amanitina coniugata con biotina in un tampone/matrice con conservanti	1 flacone 5.5 ml	B-EKAM1-BC	Pronto all'uso
Marcato enzimatico streptavidina coniugata con HRP in un tampone a base proteica con conservanti	1 flacone 11 ml	B-EKAM1-EL	Pronto all'uso
Substrato TMB TMB in un tampone citrato con H ₂ O ₂	1 flacone 11 ml	B-TMB	Pronto all'uso
Soluzione bloccante 0.25 M di Acido solforico	1 flacone 11 ml	B-ST5	Pronto all'uso Agente corrosivo

Tabella 10

^{*)} Il Reagente Bianco contiene 100 μ g/ml di α -Amanitina.

^{**)} Dopo ricostituzione i Calibratori A, B, C, D ed E contengono rispettivamente 1, 3, 10, 30 e 100 ng/ml di α -Amanitina.

^{***)} I Controlli contengono quantitativi lotto-specifici di α -Amanitina. Fare riferimento al Foglio aggiuntivo del QC per le concentrazioni reali.

CONSERVAZIONE ED EMIVITA DEI REAGENTI

Reagenti non Aperti	
I Calibratori, i Controlli e il Reagente bianco liofilici devono essere conservati a -20°C. Gli altri componenti del kit non aperti sono stabili a 2-8°C. Non utilizzare oltre la data di scadenza.	
Reagenti Aperti / Ricostituiti	
Micropiastra	Riporre le strip non utilizzate immediatamente nella busta di alluminio contenente desiccante e risigillarle. Conservarle 2 mesi a 2-8°C.
Tampone di lavaggio diluito	Conservare fino a 4 mesi a 2-8°C.
Controlli	Stabile a -20°C per almeno 3 mesi
Calibratori	
Reagente bianco	
Tampone di incubazione	Stabile a 2-8°C fino alla data di scadenza indicata sul flacone
Coniugato biotinilato	
Marcato enzimatico	
Substrato TMB	Conservare al buio a 2-8°C fino alla data di scadenza
Soluzione bloccante	Conservare a 18-28°C.

Table 11

AVVERTENZE E PRECAUZIONI

- **Substrato e soluzione stoppante:** il substrato di TMB (B-TMB) contiene tetrametilbenzidina, perossido d'idrogeno (H₂O₂) e dimetilformamide. La soluzione stoppante (B-STP) contiene acido solforico (0.25 M). Ciascuno di questi reagenti è irritante per gli occhi, la pelle e le mucose. Evitare il contatto con occhi, pelle e vestiario. Indossare indumenti protettivi, guanti e protezioni per gli occhi. Se viene a contatto con gli occhi, la pelle e gli indumenti lavarsi immediatamente con molta acqua. Se viene a contatto con gli occhi, la pelle e gli indumenti lavarsi immediatamente con molta acqua.
- **Il reagente bianco, i calibratori, i controlli ed il coniugato biotina** contengono α-Amanitina. Evitare l'ingestione di questi reagenti.
- In merito alle precauzioni adeguate per lo smaltimento di reagenti del kit, consigliamo vivamente di consultare prima le normative locali speciali del proprio paese.

PRECAUZIONI TECNICHE

Reagenti

- **Residui rimasti nei pozzetti** sono causati dal processo di produzione. Questi residui vengono completamente eliminati dai lavaggi durante la procedura descritta e non compromettono in alcun modo i risultati. (fare riferimento al punto 3 delle istruzioni per l'uso).
- Leggere attentamente le istruzioni prima di eseguire il test. Le prestazioni del test subiranno un effetto negativo se si utilizzano reagenti diluiti in modo errato, modificati o conservati diversamente da come specificato nelle presenti istruzioni per l'uso.
- I componenti non devono essere utilizzati dopo la data di scadenza riportata sulle etichette.
- Non miscelare reagenti appartenenti a lotti diversi.
- Lasciare che i reagenti raggiungano la temperatura ambiente. Ricostituire i reagenti liofilizzati secondo le indicazioni. Miscelare bene (agitare in modo vorticoso) i reagenti prima dell'uso.
- I micropozzetti non possono essere riutilizzati.
- E' necessario evitare il ripetuto congelamento e scongelamento dei campioni e dei reagenti forniti nel kit.
- L'enzima (HRP) utilizzato come marcato è inattivato dall'ossigeno ed è altamente sensibile alla sodio azide, al thimerosal, all'acido ipocloroso ed ai cloroidrocarburi aromatici che spesso si ritrovano nell'acqua del laboratorio. Quindi, utilizzare solo acqua di elevata qualità deionizzata o distillata.

- Se la concentrazione iniziale di un campione non noto è superiore al calibratore più elevato (calibratore E), il campione deve essere ulteriormente diluito con il tampone di incubazione e dosato ancora secondo quanto previsto dal dosaggio. Il fattore di diluizione che ne risulta deve essere conservato per i calcoli finali.

MATERIALI RICHIESTI MA NON FORNITI

- Pipette di Precisione con puntali monouso per pipette da 40 µl, 50 µl, 100 µl ed 1 ml.
- Pipette a ripetizione con puntali monouso da 50 µl e 100 µl.
- Provette monouso di polistirene o polipropilene per la preparazione di diluizioni del campione.
- Cilindro da 1000 ml per la diluizione del tampone di lavaggio concentrato.
- Carta per Blottare
- Lavatore per micropiastra o erogatore a spruzzo per il tampone di lavaggio.
- Rotatore per micropiastra.
- Lettore per micropiastra per la misurazione dell'assorbanza a 450 nm.

RACCOLTA E CONSERVAZIONE DEI CAMPIONI

- Il dosaggio richiede meno di 50 µl d'urina, siero o plasma.
- Prelevare i campioni di urina, siero o plasma e mantenere il campione refrigerato. Le aliquote possono essere conservate fino a 7 giorni a 2-8°C o per almeno 6 mesi congelato a -20°C.
- Per raggiungere una più elevata sensibilità, la raccolta del campione deve essere fatta entro 36 ore dall'ingestione dei funghi (cf. Intervalli di referenza e interpretazione dei risultati).

PROCEDURA DEL DOSAGGIO

1. Diluire tutti i campioni 1:25 con il tampone di incubazione (e.g. 40 µl di urina + 960 µl di tampone di incubazione).
2. Preparare una piastra con strip sufficienti a testare il numero desiderato di calibratori e di campioni. Eliminare le strip in eccesso dal supporto e risigillarle **subito** in una busta insieme all'essiccante. Conservare refrigerato.
Importante: Fare in modo che i reagenti raggiungano la temperatura di 18-28 °C prima di iniziare il dosaggio.
3. Lavare i pozzetti coattati due volte utilizzando almeno 300 µl di tampone di lavaggio per pozzetto. Svuotare i pozzetti e scuotere la piastra su carta blottante.
- 4a. Dispensare 50 µl di Soluzione "Bianca" (Bianco) in duplicato nei pozzetti A1+A2.
Dispensare 50 µl di tampone di incubazione (calibratore Zero) in duplicato nei pozzetti B1+B2.
Dispensare 50 µl del calibratore A in duplicato nei pozzetti C1+C2.
Dispensare 50 µl del calibratore B in duplicato nei pozzetti D1+D2.
Dispensare 50 µl del calibratore C in duplicato nei pozzetti E1+E2.
Dispensare 50 µl del calibratore D in duplicato nei pozzetti F1+F2.
Dispensare 50 µl del calibratore E in duplicato nei pozzetti G1+G2.
- 4b. Dispensare 50 µl del Controllo Basso in duplicato nei pozzetti H1+H2.
Dispensare 50 µl del Controllo Alto in duplicato nei pozzetti A3+A4.
- 4c. Dispensare 50 µl di ciascuno dei campioni diluiti (1:25) in duplicato nei pozzetti seguenti.
5. Dispensare 50 µl di Coniugato biotinilatoa tutti i pozzetti.

6. Coprire la piastra con un foglio sigillante, collocare la piastra su un rotatore settato a 400-600 rpm ed incubare per 30 ± 5 minuti a $18-28^\circ\text{C}$.
7. Rimuovere ed eliminare il foglio sigillante. Svuotare i pozzetti e lavarli tre volte utilizzando almeno 300 μl di tampone di lavaggio per pozzetto. Svuotare i pozzetti e scuotere la piastra energicamente su carta blottante.
8. Dispensare 100 μl di Marcato Enzimatico in tutti i pozzetti.
9. Coprire la piastra con un foglio sigillante, collocare la piastra su un rotatore settato a 400-600 rpm ed incubare per 15 ± 5 minuti a $18-28^\circ\text{C}$.
10. Rimuovere ed eliminare il foglio sigillante. Svuotare i pozzetti e lavare tre volte utilizzando almeno 300 μl di tampone di lavaggio per pozzetto. Svuotare i pozzetti e scuotere la piastra energicamente su carta blottante.
11. Dispensare 100 μl della Substrato TMB TMB a tutti i pozzetti.
12. Coprire la piastra con un foglio sigillante, collocare la piastra su un rotatore settato a 400-600 rpm, proteggere la piastra dalla luce diretta ed incubare per 15 ± 5 minuti a $18-28^\circ\text{C}$.
13. Dispensare 100 μl di Soluzione bloccante a tutti i pozzetti. Eliminare le bolle d'aria con una pipetta. Procedere al punto 14 entro 30 minuti.
14. Leggere l'assorbanza a 450 nm in un lettore per micropiastra.

RISULTATI

Curva Standard

Annotare l'assorbanza a 450 nm per ciascun calibratore e pozzetto bianco (NSB). Effettuare la media dei valori duplicati, sottrarre la media dei pozzetti bianchi (NSB) ed annotare le medie (=assorbanze medie corrette). Calcolare il legame (B) di ciascuna coppia di pozzetti dei calibratori come percentuale del B_0 , con l'assorbanza corretta con NSB del B_0 preso al 100%.

$$B/B_0 (\%) = \text{percent bound} = \frac{\text{net absorbance}}{\text{net absorbance of Zero Calibrator}} \times 100$$

Plottare la percentuale di legato (asse verticale) verso la concentrazione di Amanitina in ng/ml (asse orizzontale) utilizzando una carta per grafici lin/log. Tracciare la miglior curva possibile o calcolare la curva standard utilizzando un algoritmo a quattro parametri.

Campioni e Controlli

Annotare l'assorbanza a 450 nm per ciascun pozzetto. Effettuare la media dei valori in duplicato, sottrarre la media dei pozzetti bianchi ed annotare le medie (=assorbanza media corretta). Calcolare, come più sopra descritto, il legame di ciascuna coppia di pozzetti come percentuale del B_0 , con l'assorbanza corretta con NSB del B_0 preso al 100%. Localizzare il valore B/B_0 dei campioni sull'asse verticale, tracciare la linea orizzontale che interseca la curva standard e leggere la concentrazione di Amanitina (ng/ml) dall'asse orizzontale.

Vedi Table 16 e Figure 1 Per esempi dei risultati e di curve standard. Questi risultati e le curve standard sono a solo scopo dimostrativo. Deve essere generata una curva standard per ciascun set di campioni da dosare.

Standardizzazione: Amantin ELISA è calibrato verso α -amanitina utilizzando UV/VIS: $\epsilon_{310} = 13500 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ nel H_2O .

CONTROLLO QUALITA'

E' necessaria una comprensione completa di questa metodica per un utilizzo ottimale del prodotto.

Risultati affidabili verranno ottenuti solo utilizzando precise tecniche di laboratorio (attuali linee guida GLP) e seguendo accuratamente le istruzioni di questa metodica.

La riproducibilità dei parametri della curva standard e dei valori dei controlli devono essere entro limiti stabiliti di accettabilità. I limiti di confidenza per i controlli sono sotto specifici e sono stampati sul foglio aggiuntivo di QC.

Se la precisione del dosaggio non correla con i limiti stabiliti e la ripetizione esclude errori nella tecnica, verificare quanto segue: i) dispensazione, dispositivi per il controllo della temperatura e del tempo ii) natossi del lettore ELISA iii) data di scadenza dei reagenti iv) condizioni di conservazione ed incubazione v) il TMB e la substrato TMB devono essere incolori vi) purezza dell'acqua.

LIMITI

- I reagenti forniti con questo kit sono ottimizzati per misurare α - e γ -Amanitina nell'urina, nel siero e nel plasma umani.
- LE CONCENTRAZIONI DI AMANITINA DEVONO ESSERE UTILIZZATE COME DATI SUPPLEMENTARI DA FORNIRE AL MEDICO QUALE AUSILIO NELLA DETERMINAZIONE DELLA DIAGNOSI. La concentrazione di Amanitina nell'urina non dipende strettamente dal momento in cui è stato prelevato il campione di urina. D'altro canto un risultato negativo nel Dosaggio ELISA non esclude automaticamente la possibilità di un'intossicazione, significa soltanto che nel campione non sono state identificate α -e γ -Amanitina. Quindi, ciascun medico deve provare se il paziente abbia ingerito o meno funghi negli ultimi giorni prima della comparsa dei sintomi. (3-5).

CARATTERISTICHE DEL DOSAGGIO

Precisione Intra-Dosaggio (intra-seduta): 6.3% (urina).

La precisione intra-dosaggio è stata calcolata dai risultati di 20 coppie di valori da quattro campioni di urina diluita ottenuti in un'unica seduta. I valori medi (ng/ml) sono presentati in Table 17.

Precisione Inter-Dosaggio (da una seduta all'altra): 7.3% (urina).

La precisione inter-dosaggio è stata calcolata dai risultati di 3 campioni di urina diluita ottenuti in 20 sedute diverse. I valori medi (ng/ml) sono presentati in Table 18.

Linearità di Diluizione/Parallelismo: 97.8% (urina):

Tre campioni di urina diluita con concentrazioni elevate di α -Amanitina sono stati diluiti (1:25 to 1:800) con il tampone di incubazione e dosati secondo la procedura indicata. I valori medi (ng/ml) sono presentati in Table 19

Recupero in Urina: 99.9%. Un campione di urina è stato diluito con quantitativi crescenti di α -Amanitina e dosato quattro volte secondo quanto indicato in metodica. I valori medi risultanti (ng/ml) sono presentati in Table 20.

Recupero in Plasma e Siero: 111.2 % (plasma), 104.6 % (siero). Due campioni uno di plasma e l'altro di siero umano, sono stati diluiti con quantitativi crescenti di α -Amanitina e dosati secondo quanto previsto in metodica. I valori (ng/ml) sono presentati in Table 21.

Sensibilità:

Limite di Quantificazione (LoQ): 1.5 ng/ml. Il limite di quantificazione di questo dosaggio è stata calcolata in 1.5 ng/ml (cut-off dei CV intra dosaggio = 15%)

Limite del Bianco (LoB): 0.22 ng/ml. Sono stati dosati in un'unica seduta venti duplicati del tampone d'incubazione. La Media e la deviazione standard sono state calcolate per i valori d'assorbanza. La dose minima d'Amanitina rilevata è stata calcolata in 0.22 ng/ml aggiungendo due deviazioni standard all'assorbanza media del reagente bianco (tampone di incubazione) e intersecando il valore con la curva standard ottenuta nella stessa seduta.

Specificità: Sono state determinate le seguenti crossreazioni dell'anticorpo policlonale di coniglio anti- α -Amanitin al 50% del legame con diverse natossine e Fallotossine.

α -Amanitina : 100.0 %	ϵ -Amanitina : 0.1 %
β -Amanitina : 0.1 %	Falloidina: non rilevabile
γ -Amanitina : 90.0 %	Fallacidina: non rilevabile

INTERVALLI DI REFERENZIA E INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

100 campioni di siero e 75 di urine di donatori sani sono stati dosati secondo la procedura del dosaggio. I risultati sono riportati nella Table 22.

In uno studio indipendente di Staack et al. (6) 100 campioni di urine di donatori, sottoposti ad esame per abuso di farmaci, sono stati analizzati con il kit Bühlmann Amanitin ELISA. Tutti i campioni hanno dato risultati inferiori al LoQ di 1.5 ng/mL. (vedere Caratteristiche del Dosaggio).

Pertanto, nelle urine i valori di amanitina al di sopra di **LoQ di 1.5 ng/ml** indicano una possibile intossicazione da amanitina.

In uno studio clinico di Butera et al. (7) 61 campioni di pazienti con intossicazione apparente da amanitina sono stati tenuti sotto stretta osservazione. 10 pazienti avevano un'intossicazione da amanitina clinicamente confermata. I campioni urinari raccolti **entro 36 ore** (n=6) dall'ingestione dei funghi mostravano una sensibilità ed una specificità del 100% applicando un **cut-off di 5 ng/ml** (vedere Table 12).

Importante: La sensibilità diminuisce rapidamente se i campioni sono stati raccolti successivamente (vedere Figure 2; *Livelli urinari di amanitina tracciati su grafico rispetto al tempo nella popolazione studiata (n=61). In 20 casi i livelli di amanitina coincidono con i simboli visibili (i valori al disotto di 1.5 ng/ml nei campioni di urina raccolti tra 6 e 24 ore dopo l'ingestione di funghi). I simboli indicano pazienti avvelenati da natossine (n=10), i simboli aperti indicano pazienti con altre diagnosi (n=51). I quadratini identificano casi di epatite acuta o danno epatico (n=8).*

NOTE IMPORTANTI:

- **Bühlmann raccomanda di tener conto di questi valori soltanto come linea guida.** La quantizzazione dell'intossicazione da amanitina attraverso un dosaggio ELISA deve essere considerata quale ulteriore strumento nell'insieme delle procedure diagnostiche e non deve sostituirsi alla decisione diagnostica finale del medico/tossicologo responsabile.
- Un risultato negativo non esclude una possibile intossicazione da amanitina.
- Per raggiungere una più elevata sensibilità, la raccolta del campione deve essere fatta entro 36 ore dall'ingestione dei funghi.
- Il kit ELISA Bühlmann Amanitin mostra una debolissima cross-reattività alla β -amanitina. Pertanto possono essere rilevate soltanto α - e γ -amanitina (vedere Caratteristiche del Dosaggio). Le intossicazioni da β -amanitina possono non essere rilevate.

Accuratezza Diagnostica (%)	SENS	SPEC	PPV	NPV
Tutti i pazienti compresi nello studio (n=61)				
Livelli di amanitina urinari ≥ 1.5 ng/ml	70.0	82.4	43.8	93.3
Livelli di amanitina urinari ≥ 5.0 ng/ml	60.0	100.0	100.0	92.7
Pazienti studiati nelle 36 ore (n=51)				
Livelli di amanitina urinari ≥ 1.5 ng/ml	100.0	87.2	50.0	100.0
Livelli di amanitina urinari ≥ 5.0 ng/ml	100.0	100.0	100.0	100.0

Table 12 secondo Butera et al. 2004 (7)

USO PREVISTO

El kit ELISA Amanitina de BÜHLMANN ha sido diseñado para realizar la determinación diagnóstica directa y cuantitativa *in vitro* de α - y γ -Amanitina presentes en orina, suero y plasma humanos.

PRINCIPIOS BÁSICOS DEL ENSAYO

El ELISA Amanitina de BÜHLMANN es un inmunoensayo competitivo. Un anticuerpo (Ac) policlonal específico para α - y γ -Amanitina recubre los pocillos de la placa de microtitulación. Durante la primera incubación la Amanitina presente en las muestras prediluidas de orina y en los calibradores, respectivamente, compite con Amanitina ligada a biotina por los sitios de unión del anticuerpo anti-Amanitina específico de conejo. Después del lavado se añade estreptavidina conjugada con peroxidasa de rábano (HRP), la cual se une durante un segundo paso de incubación a los complejos Ac-Biotina. El marcador de enzima sin unir se elimina con un segundo paso de lavado y se añade solución substrato con tetrametilbenzidina (TMB) a los pocillos. Durante el siguiente paso de incubación se forma un producto coloreado en proporción inversa a la cantidad de Amanitina presente en la muestra. Con la adición de la solución de interrupción ácida el color cambia de azul a amarillo y puede medirse a 450 nm.

REACTIVOS INCLUIDOS Y PREPARACIÓN

Reactivos	Cantidad	Código	Reconstitución
Placa de microtitulación recubierta con Ac policlonal anti- α -Amanitina.	12 x 8 pocillos	B-EKAM1-MP	Listo para usar
Sellador de placas	3 unidades		
Tampón de lavado concentrado (10x) con conservantes	1 botella 100 ml	B-EKAM1-WB	Diluir con 900 ml de agua desionizada
Tampón de incubación con conservantes	1 botella 100 ml	B-EKAM1-IB	Listo para usar
Reactivo blanco ^{*)} amanitina liofilizada en una matriz de tampón con conservantes	1 vial liofilizado	B-EKAM1-BR	Añadir 1 ml de tampón de incubación
Calibradores A a E ^{**) (} α -amanitina liofilizada en una matriz de tampón con conservantes	5 viales	B-EKAM1-CASET	Añadir 1 ml de tampón de incubación
Control bajo / alto ^{***)} amanitina liofilizada en orina humana	2 viales	B-EKAM1-CONSET	Añadir 1 ml de tampón de incubación
Conjugado de biotina amanitina conjugada con biotina en una matriz de tampón con conservantes	1 vial 5,5 ml	B-EKAM1-BC	Listo para usar
Marcador de enzima estreptavidina conjugada con HRP en un tampón de proteínas con conservantes	1 vial 11 ml	B-EKAM1-EL	Listo para usar
Substrato TMB TMB en tampón citrato con H ₂ O ₂	1 vial 11 ml	B-TMB	Listo para usar
Solución de interrupción Ácido sulfúrico 0,25 M	1 vial 11 ml	B- STS	Listo para usar Agente corrosivo

Tabla 13

^{*)} El Reactivo blanco contiene 100 µg/ml de α -Amanitina.

^{**) (} Después de la reconstitución los Calibradores A, B, C, D y E contienen 1, 3, 10, 30 y 100 ng/ml de α -Amanitin, respectivamente.

^{***)} Los Controles contienen cantidades específicas del lote de α -Amanitina. Consulte la hoja de datos de control de calidad adicional para las concentraciones efectivas.

ALMACENAMIENTO Y DURACIÓN DE LOS REACTIVOS

Reactivos sin abrir	
Los Calibradores liofilizados, Controles y Solución blanco deben almacenarse a -20°C. Los otros componentes del kit sin abrir son estables a 2-8°C. No utilice el kit pasada la fecha de caducidad.	
Reactivos abiertos / reconstituidos	
Placa de microtitulación	Guarde inmediatamente las tiras que no ha utilizado en la bolsa de aluminio que contiene los sacos desecantes y vuelva a cerrarla completamente por toda la cremallera. Almacénese hasta 2 meses a 2-8°C.
Tampón de lavado diluido	Almacénese hasta 4 meses a 2-8°C.
Controles	Estable a -20°C 3 meses como mínimo
Calibradores	
Reactivo blanco	
Tampón de incubación	Estable a 2-8°C hasta la fecha de caducidad impresa en el vial
Conjugado de biotina	
Marcador de enzima	
Solución substrato	Almacénese a oscuras a 2-8°C hasta la fecha de caducidad.
Solución de interrupción	Almacénese a 18-28°C.

Tabla 14

PRECAUCIONES

PRECAUCIONES DE SEGURIDAD

- **Solución substrato y solución de interrupción:** La solución de pretratamiento (B-EKDSM-PRS) contiene hidróxido de sodio (NaOH) y la solución neutralizante (B-EKDSM-NS) contiene ácido clorhídrico (HCl). La solución substrato (B-TMB) contiene tetrametilbenzidina (TMB), peróxido de hidrógeno y dimetilformamida. La solución de interrupción (B-STs) contiene ácido sulfúrico. Los dos reactivos pueden irritar los ojos, la piel y las membranas mucosas. Evite el contacto con los ojos, la piel y la ropa.
- **Reactivo blanco, Calibradores, Controles y Conjugado de biotina:** Contienen α -amanitina. Evite la ingestión de estos reactivos.
- En cuanto a las precauciones adecuadas para la eliminación de los reactivos del kit, recomendamos encarecidamente consultar con anterioridad la normativa local específica de su país.

PRECAUCIONES TÉCNICAS

- **Residuos pueden formarse en los pocillos** durante el proceso de la producción. Ellos están eliminados completamente durante el lavado de los pocillos y no tienen ninguna influencia en los resultados (véase a punto 3 de la instrucción de uso).
- Lea atentamente las instrucciones antes de realizar el ensayo. El rendimiento del ensayo se verá gravemente afectado si los reactivos son incorrectamente diluidos, modificados o almacenados en condiciones distintas a las que se detallan en estas instrucciones de uso.
- Los componentes no deben utilizarse después de la fecha de caducidad impresa en las etiquetas.
- No mezcle diferentes lotes de reactivos.
- Debe hacerse todo lo posible para garantizar que no se produzca contaminación cruzada entre reactivos, muestras o entre pocillos.
- Deje atemperar los reactivos hasta que alcancen la temperatura ambiente. Mezcle bien (con agitador de vórtice) los reactivos antes de su uso.
- Los micropocillos no pueden ser reutilizados.
- Debe evitarse la congelación y descongelación repetidas de las muestras y los reactivos suministrados con el kit.
- La enzima (HRP) utilizada como marcador se inactiva por oxígeno y es muy sensible a azida sódica, timerosal, ácido hipocloroso y clorohidrocarburos aromáticos, que se encuentran con frecuencia en los suministros de agua de

laboratorio. Por tanto, utilice únicamente agua desionizada o destilada de alta calidad.

- Si la concentración inicial de una muestra desconocida es mayor que el calibrador más alto (calibrador E), la muestra debe diluirse con tampón de incubación y ensayarse de nuevo según el procedimiento del ensayo. El factor de dilución resultante debe tenerse en cuenta para los cálculos finales.

MATERIALES NECESARIOS NO INCLUIDOS

- Pipetas de precisión con puntas desechables de 40 µl, 50 µl, 100 µl y 1 ml.
- Pipetas múltiples con puntas desechables de 50 µl y 100 µl.
- Tubos desechables de poliestireno o polipropileno para la preparación de las diluciones de muestra.
- Cilindro de 1000 ml para la dilución del tampón de lavado concentrado.
- Papel secante
- Lavador de placas de microtitulación o botella flexible para el tampón de lavado.
- Agitador de placas de microtitulación.
- Lector de placas de microtitulación para la medición de la absorbancia a 450 nm.

RECOGIDA Y ALMACENAMIENTO DE MUESTRAS

- El procedimiento del ensayo requiere menos de 50 µl de orina, suero o plasma.
- Recoja la orina, suero o plasma del paciente y mantenga la muestra refrigerada. Las alícuotas pueden almacenarse hasta 7 días a 2-8°C ó 6 meses como mínimo congeladas a -20 °C.
- Para obtener la mayor sensibilidad la recogida de las muestras debe realizarse dentro de las 36 horas posteriores a la ingestión de las setas (vease "Valores normales e interpretación de resultados").

PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO

1. Diluya todas las muestras del paciente a 1:25 con tampón de incubación (p. ej., 40 µl de orina + 960 µl de tampón de incubación).
2. Prepare una placa con tiras suficientes para probar el número deseado de calibradores y muestras. Retire las tiras sobrantes del soporte y guárdelas en la bolsa metalizada junto con los sacos desecantes **sin demora**. Almacénelo refrigerado.
Importante: Deje que los reactivos alcancen 18-28 °C antes de preparar el ensayo.
3. Lave dos veces los pocillos recubiertos utilizando como mínimo 300 µl de tampón de lavado por pocillo. Vacíe los pocillos y sacuda la placa firmemente en papel secante.
- 4a. Pipetee 50 µl de Solución blanco (Blanco) por duplicado en los pocillos A1+A2.
Pipetee 50 µl de Tampón de incubación (Calibrador cero) por duplicado en los pocillos B1+B2.
Pipetee 50 µl de Calibrador A por duplicado en los pocillos C1+C2.
Pipetee 50 µl de Calibrador B por duplicado en los pocillos D1+D2.
Pipetee 50 µl de Calibrador C por duplicado en los pocillos E1+E2.
Pipetee 50 µl de Calibrador D por duplicado en los pocillos F1+F2.
Pipetee 50 µl de Calibrador E por duplicado en los pocillos G1+G2.
- 4b. Pipetee 50 µl del Control bajo por duplicado en los pocillos H1+H2.

Pipetee 50 µl del Control alto por duplicado en los pocillos A3+A4.

- 4c. Pipetee 50 µl de cada muestra diluida (1:25) en los pocillos subsiguientes.
5. Pipetee 50 µl de Conjugado de biotina en todos los pocillos.
6. Cubra la placa con un sellador de placas, colóquela en un mezclador de placas ajustado a 400-600 rpm e incube durante 30 ± 5 minutos a 18-28°C.
7. Retire y deseche el sellador de placa. Vacíe los pocillos y lávelos tres veces utilizando como mínimo 300 µl de tampón de lavado por pocillo. Vacíe los pocillos y sacuda la placa firmemente en papel secante.
8. Pipetee 100 µl de marcador de enzima en todos los pocillos.
9. Cubra la placa con un sellador de placas, colóquela en un mezclador de placas ajustado a 400-600 rpm e incube durante 15 ± 5 minutos a 18-28°C.
10. Retire y deseche el sellador de placa. Vacíe los pocillos y lávelos tres veces utilizando como mínimo 300 µl de tampón de lavado por pocillo. Vacíe los pocillos y sacuda la placa firmemente en papel secante.
11. Pipetee 100 µl de solución substrato de TMB en todos los pocillos.
12. Cubra la placa con un sellador de placas, colóquela en un mezclador de placas ajustado a 800-1000 rpm, proteja la placa de la luz directa e incube durante 15 ± 5 minutos a 18-28°C.
13. Pipetee 100 µl de solución de interrupción en todos los pocillos. Elimine las burbujas de aire con la punta de una pipeta. Continúe con el paso 14 al cabo de 30 minutos como máximo.
14. Lea la absorbancia a 450 nm en un lector de placas de microtitulación.

RESULTADOS

Curva estándar

Registre la absorbancia a 450 nm para cada pocillo del calibrador y blanco (NSB). Calcule el promedio de los valores d, résteles el promedio de los pocillos del blanco (NSB) y registre los promedios (= absorbancia media corregida). Calcule la unión (B) de cada par de pocillos del calibrador como un porcentaje del B₀, considerando la absorbancia del B₀ corregida por el NSB como el 100%.

$$B/B_0 (\%) = \text{porcentaje unido} = \frac{\text{absorbancia neta}}{\text{absorbancia neta del Calibrador cero}} \times 100$$

Represente el porcentaje unido (eje vertical) frente a la concentración de Amanitina en ng/ml (eje horizontal) utilizando un papel gráfico semilogarítmico. Dibuje la mejor curva de ajuste o calcule la curva estándar utilizando un algoritmo de cuatro parámetros.

Muestras y controles

Registre la absorbancia a 450 nm para cada pocillo de la muestra. Calcule el promedio de los valores, résteles el promedio de los pocillos del blanco y registre los promedios (= absorbancia media corregida). Calcule, como se ha descrito anteriormente, la unión de cada par de pocillos de la muestra como un porcentaje del B₀, considerando la absorbancia del B₀ corregida por el NSB como el 100%. Localice el valor B/B₀ de las muestras en el eje vertical,

dibuje una línea horizontal que corte la curva estándar y lea la concentración de Amanitina (ng/ml) en el eje horizontal.

Véanse los ejemplos de resultados (Table 16) y curvas estándar (Figure 1). *Estos resultados y curvas estándar se ofrecen únicamente con propósitos de demostración. Se debe generar una curva estándar para cada conjunto de muestras que se ensaye.*

Estandarización: Amanitin ELISA è calibrato con α -Amanitina utilizando UV/VIS: $\epsilon_{310} = 13500 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ en H_2O .

CONTROL DE CALIDAD

Es necesario una completa comprensión de este prospecto para que el uso del producto dé unos resultados satisfactorios. Sólo se obtendrán resultados fiables utilizando técnicas de laboratorio precisas (guías de Buenas Prácticas de Laboratorio actuales) y siguiendo cuidadosamente este prospecto.

La reproducibilidad de los parámetros de la curva estándar y de los valores de control debe encontrarse dentro de los límites establecidos de aceptabilidad del laboratorio. Los límites de confianza para los controles son específicos del lote y están impresos en la hoja de datos de control de calidad adicional.

Si la precisión del ensayo no se correlaciona con los límites establecidos y la repetición excluye errores de la técnica, compruebe los siguientes aspectos: i) instrumentos de pipeteado, control de temperatura y tiempo ii) ajustes del lector de ELISA iii) fechas de caducidad de los reactivos iv) condiciones de almacenamiento e incubación v) la solución substrato con TMB debe ser incolora vi) pureza del agua.

LIMITACIONES DE RENDIMIENTO

- Los reactivos suministrados con este kit están optimizados para medir α - y γ -Amanitina en orina, suero y plasma humanos.
- LAS CONCENTRACIONES DE AMANITINA DEBEN UTILIZARSE COMO DATOS SUPLEMENTARIOS DISPONIBLES PARA EL MÉDICO PARA ESTABLECER UN DIAGNÓSTICO. La concentración de Amanitina en orina depende en gran medida del momento de la recogida de la orina del paciente. Por otra parte, un resultado negativo del ELISA no excluye automáticamente una posible intoxicación. Significa únicamente que no ha podido detectarse α - y γ -Amanitina en la muestra. Por lo tanto, el médico tiene que comprobar si el paciente ha comido setas en los días anteriores a la aparición de los síntomas.

CARACTERÍSTICAS DE EFICIENCIA

Precisión intra-ensayo (dentro de la prueba): 6,3% (orina). La precisión intra-ensayo se calculó a partir de los resultados de 20 duplicados de cuatro muestras de orina con adición ("spiked") obtenidos en una única prueba. Los valores medios (ng/ml) se presentan en Table 17.

Precisión inter-ensayo (prueba a prueba): 7,3% (orina). La precisión inter-ensayo se calculó a partir de los resultados de 3 muestras de orina con adición obtenidos en 20 pruebas diferentes. Los valores medios (ng/ml) se presentan en Table 18.

Linealidad/paralelismo de dilución: 97,8% (orina). Se diluyeron (1:25 a 1:800) tres muestras de orina humana con adición con una alta concentración de α -Amanitina con tampón de incubación y se ensayaron según el procedimiento del ensayo. Los valores medios (ng/ml) se presentan en Table 19.

Recuperación del spiking en orina: 99,9%. Se ensayó cuatro veces según el procedimiento del ensayo una muestra de orina a la que se añadieron cantidades

crecientes de α -Amanitina. Los valores medios resultantes (ng/ml) se presentan en Table 20.

Recuperación del spiking en plasma y suero: 111,2 % (plasma), 104,6 % (suero). Se añadieron a una muestra de plasma y otra de suero humanos cantidades crecientes de α -Amanitina y se ensayaron según el procedimiento del ensayo. Los valores (ng/ml) se presentan en Table 21.

Sensibilidad:

Límite de cuantificación: 1,5 ng/ml. El límite de cuantificación de este análisis es 1,5 ng/ml (valor de corte de intra-ensayo CV= 15%).

Límite del blanco (LoB): 0,22 ng/ml. Se ensayaron veinte duplicados de tampón de incubación en una única prueba. Se calcularon la media y la desviación estándar de los valores de absorbancia. La dosis mínima detectable de Amanitina se calculó en 0,22 ng/ml añadiendo dos desviaciones estándar a la absorbancia media del B_0 (tampón de incubación) y cortando este valor con la curva estándar obtenida en la misma prueba.

Especificidad: Se han determinado en el 50% de unión las siguientes reacciones cruzadas del anticuerpo policlonal anti- α -Amanitina de conejo con diferentes Amatoxinas y Falotoxinas.

α -Amanitina:	100,0 %	ϵ -Amanitina:	0,1 %
β -Amanitina:	0,1 %	Faloidina:	indetectable
γ -Amanitina:	90,0 %	Falacidina:	indetectable

VALORES NORMALES E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

Se midieron según el procedimiento del ensayo 75 muestras de orina y 100 de suero de donantes no afectados. Los resultados se presentan en la Table 22.

En un estudio independiente de Staack et al. (6) se probaron con el Bühlmann Amanitin ELISA 100 muestras de orina de donantes probados para abuso de drogas. Todas las muestras se midieron por debajo de la DMDF de 1,5 ng/ml (véase Características de Eficiencia).

Por tanto, unos valores de amanitina por encima de la **LoQ de 1,5 ng/ml** indican una posible intoxicación por amanitina.

En el estudio clínico de Butera et al. (7) se investigaron minuciosamente 61 muestras de pacientes con supuesta intoxicación por amanitina. Diez pacientes presentaron una intoxicación por amanitina confirmada clínicamente. Las muestras urinarias recogidas **dentro de las 36 horas** ($n=6$) posteriores a la ingestión de las setas mostraron una sensibilidad y especificidad del 100% al aplicar un **valor de corte de 5 ng/ml** (véase la Table 15). **Importante:** La sensibilidad disminuye rápidamente si se recogen las muestras en un estadio posterior (véase la Figure 2; *Niveles urinarios de amanitina según el tiempo en la población del estudio* ($n=61$)). En 20 casos los niveles de amanitina se superponen a los símbolos visibles (valores por debajo de 1,5 ng/ml en muestras de orina recogidas entre 6 y 24 horas después de la ingestión de setas). Los símbolos cerrados indican pacientes envenenados con amatoxina ($n=10$); los símbolos abiertos, pacientes con otros diagnósticos ($n=51$). Los cuadrados identifican casos de lesión hepática o hepatitis aguda documentadas ($n=8$)).

NOTAS IMPORTANTES:

- **Bühlmann recomienda encarecidamente que estos valores se consideren únicamente a modo orientativo.** La cuantificación de la intoxicación por amanitina por ELISA debe considerarse un instrumento adicional en el estudio diagnóstico completo, y no debe sustituir la decisión diagnóstica final del médico/toxicólogo responsable.

- Un resultado negativo no excluye una posible intoxicación por amanitina.
- Para obtener la mayor sensibilidad la recogida de las muestras debe realizarse dentro de las 36 horas posteriores a la ingestión de las setas.
- El Bühlmann Amanitin ELISA no presenta reactividad cruzada con β -amanitina. Por tanto, sólo puede detectarse α - y γ -amanitina (véase Características de Eficiencia). Puede que no se detecten intoxicaciones con β -amanitina.

Precisión Diagnóstica (%)	SENS	ESPE	VPP	VPN
Todos los pacientes incluidos en el estudio (n=61)				
Niveles urinarios de amanitina $\geq 1,5$ ng/ml	70,0	82,4	43,8	93,3
Niveles urinarios de amanitina $\geq 5,0$ ng/ml	60,0	100,0	100,0	92,7
Pacientes evaluados en un plazo de 36 horas (n=51)				
Niveles urinarios de amanitina $\geq 1,5$ ng/ml	100,0	87,2	50,0	100,0
Niveles urinarios de amanitina $\geq 5,0$ ng/ml	100,0	100,0	100,0	100,0

Table 15: según Butera et al. 2004 (7)

Table 16: Example of Results

	Absorb. (OD)	CV (%)	B/B ₀ (%)	Conc. (ng/ml)
Blank	0.120			
B0	2.301		101.2	0
B0	2.246		98.8	
B0 Avg.	2.273	1.7	100.0	
Cal A	2.048		90.1	1.0
Cal A	1.946		85.6	
Cal A Avg.	1.997	3.6	87.8	
Cal B	1.567		68.9	3.0
Cal B	1.491		65.6	
Cal B Avg.	1.529	3.5	67.2	
Cal C	0.787		34.6	10.0
Cal C	0.783		34.4	
Cal C Avg.	0.785	0.4	34.5	
Cal D	0.218		9.6	30.0
Cal D	0.202		8.9	
Cal D Avg.	0.210	5.4	9.2	
Cal E	0.073		3.2	100.0
Cal E	0.069		3.0	
Cal E Avg.	0.071	4.0	3.1	
Control low	1.316		57.9	4.3
Control low	1.293		56.9	4.4
Control low Avg.	1.304	1.2	57.4	4.35
Control high	0.307		13.5	25.6
Control high	0.295		13.0	26.5
Control high Avg.	0.301	2.8	13.3	26.1

ED-20 = 17.6 ng/ml ED-50 = 5.6 ng/ml ED-80 = 1.7 ng/ml

Figure 1: Example of Standard Curve

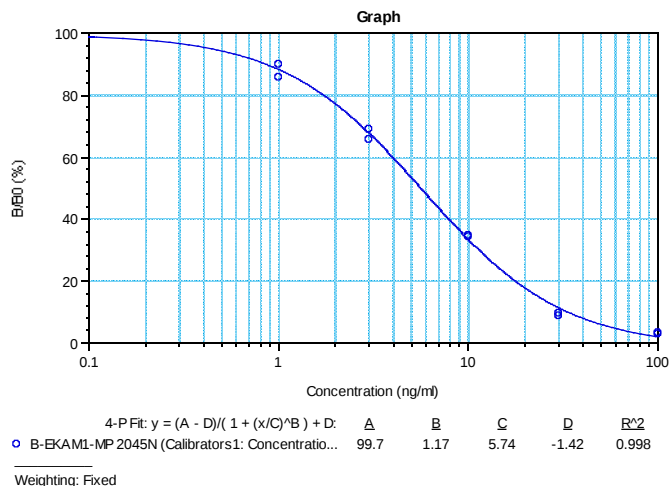


Table 17: Intra-Assay Precision

Sample type (spiked)	n	Sample range (mean)	C.V. (%) Range	Mean of C.V. (%)
Urine	4	3.1 – 90.8	2.8 – 14.0	6.3
EDTA-plasma	4	4.6 – 103.0	4.5 – 12.6	7.5
Serum	3	9.0 – 81.5	5.0 – 17.6	13.1

Table 18: Inter-Assay Precision

Sample type (spiked)	n	Sample range (mean)	C.V. (%) Range	Mean of C.V. (%)
Urine	3	6.7 – 81.8	5.3 – 10.6	7.3
EDTA-plasma	4	3.2 – 76.6	9.3 – 14.0	11.6
Serum	4	2.6 – 81.4	9.9 – 21.4	14.0

Table 19: Dilution Linearity/Parallelism

Samples	Dilution	Observed	Expected	Recovery O/E (%)
Urines (n=3)	1:25	106.95		
	1:50	42.28	53.50	79.0
	1:100	24.09	26.80	89.9
	1:200	12.29	13.40	91.7
	1:400	7.09	6.70	105.8
	1:800	3.97	3.34	119.0
Mean				97.8

Table 20: Spiking Recovery in Urine

Samples	Spiked with	Observed	Expected	Recovery O/E (%)
Basic Value: 0.2 ng/ml (n=4)	2	1.8	2.2	80.0
	5	4.9	5.2	94.4
	10	9.5	10.2	92.5
	20	19.8	20.2	97.9
	50	53.7	50.2	106.9
	80	102.3	80.2	127.5
Mean				99.9

Table 21: Spiking Recovery in Plasma and Serum

Sample	Spiked with	Observed	Expected	Recovery (O/E) (%)
Plasma Basic Value: 0.8 ng/ml	2	3.2	2.8	113.8
	5	6.6	5.8	112.8
	10	12.4	10.8	114.7
	20	23.6	20.8	113.1
	50	50.1	50.8	98.6
	80	92.4	80.8	114.3
Mean				111.2
Serum Basic Value: 0.8 ng/ml	2	3.2	2.4	132.5
	5	5.7	5.4	105.5
	10	10.3	10.4	98.7
	20	20.6	20.4	101.2
	50	44.7	50.4	88.6
	80	81.0	80.4	100.8
Mean				104.6

Table 22: Normal Values

	Urine ng/ml	Serum ng/ml
Total (n)	75	100
Median	0.4	0.8
95th Quantile	0.8	1.3
99th Quantile	1.1	1.8
Min./Max	0/1.3	0.2/2.3
Mean	0.4	0.9
SD	0.2	0.3
Mean+3SD	1.1	1.8

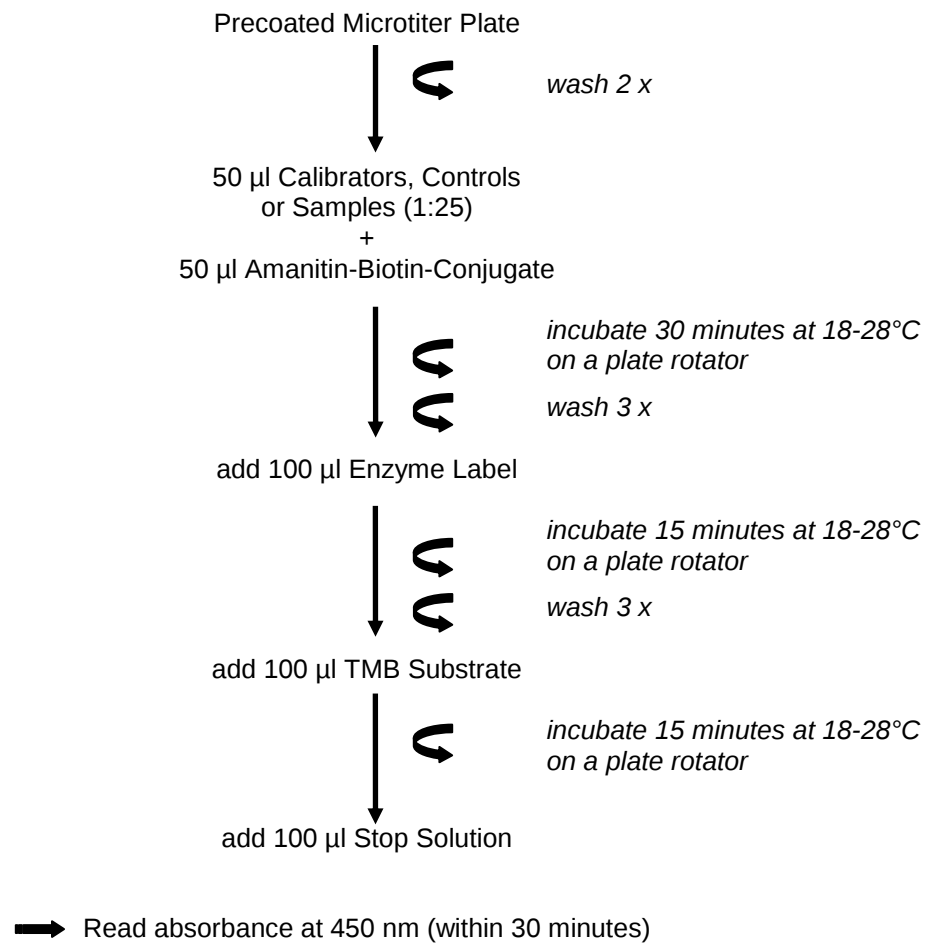
Figure 1 is a scatter plot showing urinary excretion of amanitin. The y-axis is labeled 'urinary amanitin (ng/ml)' and has a scale break between 25 and 60. The x-axis is labeled 'hours after mushroom ingestion' and ranges from 0 to 96. A vertical dotted line at 36 hours indicates the limit of detection. Data points for 10 patients (open circles) and 10 healthy controls (filled squares) are plotted. The healthy controls show significantly higher urinary amanitin levels, mostly above 25 ng/ml, while the patients show levels mostly below 5 ng/ml.

Hours after ingestion	Urinary amanitin (ng/ml) - Healthy Controls (filled squares)	Urinary amanitin (ng/ml) - Patients (open circles)
0	0	0
6	0	0
12	80	0
18	22	0
24	160	0
30	14	0
36	10	0
48	0	2
60	0	0
72	0	0
84	0	0
96	0	0

BÜHLMANN Amanitin ELISA

1. Andres RY et al.: *Radioimmunoassay for amatoxins by use of a rapid, ¹²⁵I-tracer-based system.* Clin Chem. **32**, 1751-5 (1986).
2. Andres RY et al.: *(¹²⁵I)amatoxin and anti-amatoxin for radioimmunoassay prepared by a novel approach: chemical and structural considerations.* Toxicon **25**, 915-22 (1987).
3. Piqueras J: *Hepatotoxic mushroom poisoning: diagnosis and management.* Mycopathologia **105**, 99-110 (1989).
4. Rabe C et al.: *Vorgehen bei Knollenblätterpilzvergiftungen.* Dtsch med Wschr. **124**, 1073-76 (1999).
5. Piering WF and Bratanow N: *Role of the clinical laboratory in guiding treatment of Amanita virosa mushroom poisoning: a report of two cases.* Clin Chem. **36**, 571-4 (1990).
6. Staack RF and Maurer HH: *New Bühlmann ELISA for determination of Amanitins in urine – Are there false positive results due to interferences with urine matrix, drugs or their metabolites* Toxichem + Krimtech. **68**, (2) 65-70 (2000)
7. Butera R et al.: *Diagnostic accuracy of urinary amanitin in suspected mushroom poisoning: a pilot study.* J Tox Clin Tox (2004) **42,6** 901-12.

AMANITIN ELISA



TIME TO RESULT: 1 HOUR

APPENDIX IV
SYMBOLS/ SYMBOLE/ SYMBOLES/ SIMBOLI/ SIMBOLOS

Symbol	Explanation
	Use By Verwendbar bis Utiliser jusqu'au Utilizzare entro Fecha de caducidad
REF	Catalogue number Bestellnummer Référence du catalogue Numero di catalogo Número de catálogo
LOT	Batch code Chargenbezeichnung Code du lot Codice del lotto Codigo de lote
IVD	<i>In Vitro</i> Diagnostic Medical Device <i>In Vitro</i> Diagnostikum Dispositif médical de diagnostic <i>in vitro</i> Dispositivo medico-diagnostico <i>in vitro</i> Producto sanitario para diagnóstico <i>in vitro</i>
	Contains sufficient for <n> tests Ausreichend für "n" Ansätze Contenu suffisant pour „n“ tests Contenuto sufficiente per „n“ saggi Contenido suficiente para <n> ensayos
	Consult Instructions for Use- Gebrauchsanweisung beachten Consulter le mode d'emploi Consultare le istruzioni per l'uso Consulte las instrucciones de uso
	Temperature limitation Zulässiger Temperaturbereich Limites de température Limiti di temperatura Límite de temperatura
	Upper limit of temperature Temperaturobergrenze Limite supérieure de température Limite superiore di temperatura Límite superior de temperatura
MP	Microtiterplate Mikrotiter-Platte Microplaque Micropiastra Microplaca
BUF WASH 10X	Wash Buffer Concentrate (10x) Wasch-Puffer Konzentrat (10x) Concentré de tampon de lavage (10x) Tampone di lavaggio concentrato (10x) Tampón de lavado concentrado (x10)

Symbol	Explanation
BUF INC	Incubation Buffer Inkubations-Puffer Tampon d'incubation Tampone d'incubazione Tampón de incubación
REAG BLANK	Blanking Reagent Nullwert-Reagenz Réactif blanc Reagente bianco Reactivo blanco
CALA - CALE	Calibrator A - E Kalibrator A - E Calibrateur A - E Calibratore A - E Calibrador A - E
CONTROL L	Control Low Kontrolle tief Contrôle bas Controllo basso Control bajo
CONTROL H	Control High Kontrolle hoch Contrôle élevé Controllo alto Control alto
BC	Biotin Conjugate Biotin-Konjugat Conjugué Biotine Coniugato biotinilato Conjugado de Biotina
EL	Enzyme Label Enzym-Marker Marqueur enzymatique Marcato enzimatico Marcador enzimático
SUBS TMB	TMB Substrate TMB-Substrat Substrat TMB Substrato di TMB Substrato de TMB
SOLN STOP	Stop Solution Stopp-Lösung Solution stop Soluzione stoppante Solución de parada



Printing Date
2013-02-22